Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. M. Oehmichen

Das Kleinhirn bei Alkoholismus: Synapsen und Myelin im Lichtmikroskop

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –

Vorgelegt von
Gesa Lena Findeisen
aus Oldenburg i. O.

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Manfred Oehmichen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Erich Reusche

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.01.2006

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 5

Abkürzungsverzeichnis 6

1. Einleitung 7
1.1 Definition des Alkoholismus 7
1.2 Epidemiologie des Alkoholismus 8
1.3 Folgekrankheiten des Alkoholismus 8
1.4 Akute Alkoholintoxikation 13
1.5 Aufbau von Nervenzellen und Synapsen 14
1.6 Großhirn 14
1.7 Kleinhirn 15
1.7.1 Anatomie 15
1.7.2 Funktion 16
1.8 Alkoholassoziierte Schäden am Kleinhirn 16

2. Fragestellung 19

3. Material und Methoden 20
3.1 Fallmaterial 20
3.2 Präparative Aufarbeitung 21
3.2.1 Immunhistochemische Reaktionen 22
3.3 Quantifizierung 27
3.3.1 Dichte der Synapsen an den einzelnen Purkinje-Zellen . . . 27
3.3.2 Anzahl und Fläche der Glomeruli cerebellares 30
3.3.3 Grad des Myelingehaltes 31
3.3.4 Nachweis von Mallory-Körpern 34
3.4 Statistische Auswertung 34
3.4.1 Vergleich zweier Mittelwerte 35

3.4.2 Der χ^2-Test nach Pearson 36
3.4.3 Der exakte Test von Fischer 37

4. Ergebnisse 39
4.1 Qualitative Auswertung 39
4.2 Quantitative Auswertung 40
4.2.1 Dichte der Synapsen an den einzelnen Purkinje-Zellen . . . 41
4.2.2 Anzahl und Flächengröße der Glomeruli cerebellares 42
4.2.3 Grad des Myelingehaltes 46
4.2.4 Nachweis von Mallory-Körper 48

5. Diskussion 49
5.1 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit dem Schrifttum 49
5.1.1 Hirngewicht 49
5.1.2 Synapsen- und Myelingehalt des Kleinhirns 50
5.2 Kritische Betrachtung von Einzelaspekten 55
5.2.1 Fallmaterial 55
5.2.2 Präparative Aufarbeitung 55
5.2.3 Geschlechterverteilung 57
5.2.4 Alkohol und Alter 58
5.2.5 Lokalisation der Gewebeproben 59
5.2.6 Dreidimensionalität 60
5.2.7 Mallory-Körper 60
5.3 Ausblicke 61

6. Zusammenfassung 62

Literaturverzeichnis 64

Anhang 75

A. Tabellen 76

Danksagung 91

Lebenslauf 92

Abbildungsverzeichnis

3.1 Kleinhirnrinde in einer Färbung mit *Anti-Synaptophysin* Fall 34 — Alkoholiker 28
3.2 Auswertung des Farbniederschlages in dem Stratum ganglionare, Ausschnitt aus Abb. 3.1 29
3.3 Schematische Darstellung der Berechnung der Anzahl und Fläche der GC in einer Färbung mit *Anti-Synaptophysin* mit Hilfe von Messfeldern, Fall 29 — Alkoholiker 30
3.4 Windungskuppe und Windungstäler der Kleinhirnrinde in einer Färbung mit *Anti-Myelin Basic Protein* (a) Fall 40 — Kontrolle, (b) Fall 16 — Alkoholiker und (c) Fall 10 — Alkoholiker 32
3.5 Markzunge im Kleinhirn in einer Färbung mit Anti-Myelin Basic Protein (a) Fall 40 — Kontrolle, (b) Fall 10 — Alkoholiker 33
3.6 Leber in einer Färbung mit *Anti-Ubiquitin* Fall 26 — Alkoholiker 34

4.1 Box-Plot: Mediane der Flächeninhalte der Glomeruli cerebellares aller Fälle unterteilt nach Alkoholikern und Nichtalkoholikern . . 43
4.2 Diagramm: Flächendichte der Glomeruli cerebellares in den beiden Kollektiven unterteilt nach Größenklassen 44
4.3 Diagramm: Größenmedian (Median der Flächeninhalte aller vermessenen GC eines Falles) gegen die Flächendichte der GC eines Falles 45

5.1 Diagramm: Größenmediane der GC in Abhängigkeit zur postmortalen Zeitspanne bis zur Fixierung 57
5.2 Diagramm: Größenmediane der GC in Abhängigkeit zum Alter . . 59

Abkürzungsverzeichnis

μm	Mikrometer (10^{-6} m)
$\varnothing$	Mittelwert
BAK	Blutalkoholkonzentration
CO-Hb	Kohlenmonoxid Hämoglobin
CT	Computertomogramm
GC	Glomeruli cerebellares
IDMS	Interaktives Digitales Messsystem
m	männlich
MK	Mallory-Körper
MRT	Magnetresonanztomogramm
nm	Nanometer (10^{-9} m)
PZ	Purkinje-Zellen
TG	Toxikologisches Gutachten
w	weiblich
WKS	Wernicke-Korsakow-Syndrom
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Definition des Alkoholismus

Alkohol ist das geschichtlich älteste und in der westlichen Welt das am weitesten verbreitete legale Rauschmittel. Es gibt keine scharfe Trennungslinie zwischen einem Trinker[1] als Konsument und einem (abhängigen) Alkoholiker. Dies erschwert eine allgemein gültige und akzeptierte Definition des Begriffs *Alkoholismus*. Allgemein wird heute von *Alkoholismus* nur dann gesprochen, wenn eine Alkohol-Abhängigkeit vorliegt, das bedeutet, dass sowohl eine physische als auch eine psychische Abhängigkeit besteht. Das Auftreten von Alkoholfolgeschäden und Menge und Frequenz des Alkoholkonsums sind demgegenüber keine hinreichenden Kriterien, auch wenn Abhängigkeit und pathologische somatische Laborparameter hoch korrelieren [69, S. 2].

In einem aktuellen Kongressbericht aus dem Jahre 2005 betont Mann [46], dass die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Alkoholismus gesichert sind.

Nach Feuerlein [16] lassen sich unter klinischen Gesichtspunkten fünf Definitionskriterien für Alkoholismus bestimmen:

- abnormes bzw. pathologisches Trinkverhalten (nach Menge und Modalität des Alkoholkonsums)
- somatische alkoholbezogene Schäden

[1] In der gesamten Arbeit wird nur die männliche Form erwähnt, eingeschlossen ist aber immer auch das weibliche Geschlecht.

- psychosoziale alkoholbezogene Schäden
- Entwicklung von Toleranz und Entzugssyndrom (*körperliche Abhängigkeit*)
- Entwicklung von *Entzugssymptomen auf der subjektiven Ebene* (Kontrollverlust, gesteigertes Verlangen nach Alkohol, Zentrierung des Denkens und Strebens auf Alkohol, psychische Abhängigkeit)

1.2 Epidemiologie des Alkoholismus

In Deutschland lebten 1996 66 Millionen Personen, die über 18 Jahre alt waren. Laut Veröffentlichungen des Statistische Bundesamtes [4] waren davon 1,6 Millionen alkoholabhängig. Das entspricht einem Anteil von 2,4 %. Etwa 42 000 Personen sterben schätzungsweise jährlich im Zusammenhang mit akuten alkoholbezogenen Störungen.

1.3 Folgekrankheiten des Alkoholismus

In Ländern der *Ersten Welt* ist Alkoholismus die Hauptursache von Mangelernährung. Diese spielt eine große Rolle für die bei Alkoholikern angetroffenen Organschäden. Aber auch ein direkter toxischer Effekt von Alkohol und seinem Metabolit, das Acetaldehyd, beeinträchtigt die verschiedensten Körperzellen [62]. Die Folgekrankheiten des Alkoholismus sind vielfältig und betreffen nahezu alle Organe. Im Folgenden sollen nur die Funktionsausfälle von Organen näher beschrieben werden, auf die in dieser Arbeit Bezug genommen werden.

Leberschäden

Alkohol wird in der Leber metabolisiert und übt dort eine direkte toxische Wirkung aus. Zudem kommt es zu einer sekundären (durch Maldigestion und Malabsorption bedingte) Schädigung. Die Entwicklung von alkoholinduzierten Leberer-

krankungen steht dabei sowohl mit der konsumierten Alkoholmenge als auch der Art des Alkohols und der Dauer des Alkoholkonsums in Wechselbeziehung. Das Spektrum der Schädigung reicht von der Fettleber ohne entzündliche Veränderungen über verschiedene Formen der Alkoholhepatitis bis zur Leberzirrhose [69, S. 238].

Die Fettleber ist der früheste histologisch erkennbare pathologische Leberbefund und findet sich bei 90 % der Alkoholiker [8]. Ein Lebergewicht von 2000–3000 g kann erreicht werden (das Normalgewicht liegt bei 1500 g) [43]. Eine Leberzirrhose wird bei fortgeschrittenem schweren Mißbrauch beobachtet. Der kritische Schwellenwert für ihre Entstehung liegt bei einem über fünf Jahre andauernden täglichen Konsum von 60 g reinem Alkohol bei Männer und von 20 g bei Frauen. 30–50 % aller Leberzirrhosen entstehen auf dem Boden eines Alkoholmißbrauchs. Nur etwa 10–20 % der Alkoholiker aber erleiden eine Leberzirrhose. Folgen einer Zirrhose ist u. a. eine portale Hypertension mit nachfolgender Ausbildung von Aszites, Splenomegalie und Ösophagusvarizen.

Mallory-Körper, die sich histologisch nachweisen lassen können, sind das Endstadium einer Leberzelldegeneration unterschiedlichster Ursachen. Sie sind typisch für alkoholbedingte Leberschäden, aber nicht pathognomonisch. Sie kommen selten auch bei anderen Lebererkrankungen wie der primären biliäre Zirrhose, Morbus Wilson und dem primären Leberkarzinom vor [17, 69].

Pankreasschäden

Aus Obduktionsstatistiken ergab sich ein Vorkommen von Pankreasschäden bei Alkoholikern von etwa 25 %. Etwa 60–90 % aller chronischen Pankreatitiden sind Folge eines langandauernden Alkoholabusus. Die schädigende Wirkung des Alkohols entsteht nicht direkt durch toxische Einwirkungen, sondern durch eine Störung der pankreatischen Enzymsekretion. Prädisponierend sowohl für Leber- als auch für Pankreasstörungen sind genetische Faktoren. Die Prognose bei bei-

den ist bei Alkoholabstinenz im Vergleich zu Störungen anderer Genese relativ günstig.

Allgemeine Schäden im Gehirn

Die neuropathologischen Befunde, die im Gehirn von Alkoholikern beschrieben werden, sind multifaktorieller Genese. Auf der einen Seite besteht eine direkte Neurotoxizität von Alkohol und Metaboliten aus dem Alkoholstoffwechsel (v. a. Acetaldehyd), auf der anderen Seite spielen Malnutrition und Vitaminmangelerscheinungen (v. a. ein Thiamindefizit) eine Rolle [24, 78]. Eine genetische Disposition für die Empfindlichkeit des Gewebes Alkohol gegenüber wird diskutiert [5, 13]. Alkoholassoziierte Gehirnschädigungen werden ab einer täglichen Ethanolaufnahme von 100 g beobachtet, wobei es große individuelle Schwankungen gibt [39]. Pfefferbaum [58] sieht die kritische tägliche Alkoholmenge, die bei regelmäßigen Konsum zu Schädigungen führt, schon bei 80 g.
Das vollständige Schädigungsmuster ist jedoch immer noch nicht zu übersehen. Die Erholungsmöglichkeit der Gehirnfunktionen bei Abstinenz lässt vermuten, dass ein Teil der Schädigungen neurochemischer Genese ist, während Neuronenverlust in bestimmten Regionen beweisend für einen irreversiblen Schaden ist, wobei auch diese Vorgänge nur zum Teil geklärt sind [39].
Neuropathologische quantitative Untersuchungen wie auch bildgebende Verfahren (CT, MRT) dokumentieren, dass das Hirngewicht und -volumen reduziert und die Ventrikel vergößert sind [7, 13, 28, 38, 56, 66]. Rosenbloom et al. [66] zeigen in einer MRT-Studie , dass auch diese Befunde reversibel sind und sich bei Abstinenz verbessern (siehe auch [21, 46]). Die *Weiße Substanz* ist von dem Volumenverlust stärker betroffen als die *Graue Substanz*. Alkoholiker mit zusätzlichen Komplikationen (wie etwa eine Leberzirrhose oder ein *Wernicke-Korsakow-Syndrom*) zeigen die größten Verluste [22] und zusätzliche Veränderungen, z. B. an den Astrozyten [53].

Der frontale Kortex mit dem dazugehörigem Mark ist der empfindlichste Teil, während andere Regionen des Gehirns weniger bis gar nicht betroffen zu sein scheinen [13, 39]. Folgende Veränderungen werden beschrieben:

- Neuropathologische Befunde der *Weißen Substanz*:
  Nach verschiedenen Studien kommt es bereits in einem relativ frühen Stadium des Alkoholismus zu Entmarkungen in Form von Rundherden [69, S. 482]. Diese Schädigungen der *Weißen Substanz* sind am ehesten mit Veränderungen des Myelingehaltes zu erklären [28]. Das Myelin an sich zeigt keine morphologischen Veränderungen [24]. Eine axonale Degeneration als Folge von Neuronenuntergang wird diskutiert [22], wobei in einer jüngeren Studie auch der umgekehrte Prozeß für den Neuronenverlust verantwortlich gemacht wird, nämlich Zelluntergang als Folge von einer Reduktion des Myelingehaltes [29].

- Neuropathologische Befunde der *Grauen Substanz*:
  Der Rindendurchmesser und die Anzahl der Neurone sind reduziert [22, 27, 40]. Die Verminderung der Anzahl der Neurone wird als geringfügig beschrieben [22, 38, 56], kann aber bis zu 22 % annehmen [16, 44, 45]. Dabei reagieren verschiedene Populationen von Neuronen unterschiedlich auf den Alkoholeinfluß. So scheinen sowohl die Purkinje-Zellen des Kleinhirns als auch Neurone des Motorkortex mit einer relativ großen Oberfläche und in einem geringerem Ausmaß auch die Granulosazellen des Kleinhirns besonders empfindlich zu sein. Verantwortlich hierfür soll der unterschiedliche Transmitter- und Rezeptorstatus sein [24]. Auch die neuronalen Dendritenbäume des frontalen Kortex und des Motorkortex zeigen Veränderungen ihrer Struktur in Form einer Reduktion der Verzweigungen [25, 29].

  Ein zusätzlicher Aspekt der Neurotoxizität des Alkohols ist eine Unterbrechung der Neurogenese durch verzögerte Zellproliferation und gesteigerten Zelltod in der Embryonalzeit [7].

Das *Wernicke-Korsakow-Syndrom* (WKS) stellt die häufigste neurologische Begleiterscheinung im Zusammenhang mit Alkoholismus dar. Es entsteht allerdings sekundär auf dem Boden eines Thiamindefizits [15]. Etwa 3–5 % aller Alkoholiker werden davon betroffen, meist im 5.–6. Lebensjahrzehnt. Morphologische Befunde sind u. a. Läsionen der Mammilarkörper, der paraventrikulären Anteile des Gehirns und des Thalamus [21]. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch Augenmuskellähmungen mit Pupillenstörung und Gangunsicherheit, leichte delirante Symptome und durch die Korsakow-Psychose (Verlust des Altgedächtnisses, Verminderungder Spontanität, Konfabulation und Störung der Konzentration) [53]. Der Vollständigkeithalber sollen an dieser Stelle auch noch die *Zentrale Pontine Myelose*, das *Machiafava-Bignami-Syndrom* und die *laminäre Rindensklerose* erwähnt werden, die zu den sehr seltenen neurologischen Störungen mit anatomisch-pathologischem Substrat im Bereich des Großhirns im Zusammenhang mit Alkoholismus gezählt werden.

Muskelschäden

Die chronische alkoholinduzierte Myopathie ist die häufigste Muskelerkrankung in der westlichen Welt. Es wird geschätzt, dass ein bis zwei Drittel aller Alkoholiker daran leiden [69, S. 449]. Die Ursache ist auch hier noch nicht genau geklärt, vermutet werden sowohl direkte toxische Einwirkung des Alkohols an der Muskelzellmembran als auch durch Alkohol induzierte Störungen im Muskelstoffwechsel. Es werden drei Formen unterschieden, die akute und die subakute chronische Myopathie und die Rhabdomyolyse. Besonders bei der subakuten Form sind die proximalen Muskeln der unteren Extremitäten in Form einer Reduzierung der Muskelmasse betroffen [16]. Wieweit eine neurogene Schädigung eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

1.4 Akute Alkoholintoxikation

Es gibt keine spezifischen neuropathologischen Befunde, die mit der akuten Intoxikation verbunden sind. Sehr häufig jedoch lässt sich ein Hirnödem nachweisen [21, 52]. Die akute Alkoholintoxikation durchläuft mit ihren neurologischen und psychopathologischen Symptomen alle Stadien der Narkose, wie sie auch bei Intoxikationen mit anderen psychopharmakologischen Substanzen zu beobachten sind. Alkoholkonsum führt zunächst zu einer euphorischen Stimmung, die auf eine Unterdrückung kortikaler inhibierender Zentren zurückgeführt wird.
Schwere und Ausprägung der Intoxikation hängen nicht nur von der aufgenommenen Menge an Alkohol ab, sondern auch von der Magenfüllung, dem Körpergewicht, der Persönlichkeitsstruktur, der Erlebniskonstellation und auch von der Gewöhnung. Nach klinischen Gesichtspunkten lassen sich drei Stadien aufstellen [84]:

1. **Leichter Rausch** (Blutalkoholkonzentration (BAK) 0,5–1,5 ‰):
   Herabsetzung der psychomotorischen Leistungsfähigkeit, allgemeine Enthemmung, Stimulation.

2. **Mittelgradiger Rausch** (BAK 1,5–2,5 ‰):
   euphorische Glücksstimmung oder aggressive Gereitzheit, Verminderung der Selbstkritik, Befriedigung triebhafter Bedürfnisse, Gefährdung des Straßenverkehrs.

3. **Schwerer Rausch** (BAK über 2,5 ‰):
   Bewußtseinsstörung, Verlust des realen Situationsbezuges, Desorientiertheit, illusionäre situative Verkennung, motivlose Angst, Erregung, Zeichen von Funktionsstörungen des Vestibularorgans und Kleinhirns wie Nystagmus, Doppelbilder, Sprachstörungen, Ataxie, Hypotension, Hypothermie usw.

Mehr als 90 % der Patienten mit einem Blutalkoholspiegel zwischen 5 und 8 ‰

sterben. Die meisten Todesfälle akuter Alkoholvergiftungen weisen einen Blutalkoholspiegel von 2–6 ‰ auf. Die *dosis letalis* wird auf etwa 4 ‰ geschätzt. Bei Alkoholikern kann diese jedoch aufgrund der Toleranzentwicklung höher liegen. Der Tod tritt durch einen zentralen toxischen Atemstillstand mit anschließendem Rechtsherzversagen ein [52].

1.5 Aufbau von Nervenzellen und Synapsen

Morphologisch sind Nervenzellen u. a. gekennzeichnet durch einen Zellkörper (Perikaryon) und durch Fortsätze (mehrere Dendriten und ein Axon). Dendriten empfangen Signale von anderen Nervenzellen und leiten die Erregung zum Zellkörper hin, sie sind afferent. Das Axon ist zuständig für die efferente Erregungsleitung. Die Kontaktstelle zwischen Axon und einer folgenden Struktur wird als Synapse bezeichnet. Die präsynaptischen Bläschen enthalten als eigentliche Funktionsträger Neurotransmitter. Ihre trilaminäre Membran enthält Enzyme und Synapsin, das der Befestigung der Bläschen am Zytoskelett dient. Die Bläschen haben einen Durchmesser von 40–150 nm. Bei Eintreffen eines Signals in Form eines Aktionspotentials bewegen sich die präsynaptischen Bläschen in Richtung des synaptischen Spaltes, in den sie dann ihren Transmitter freisetzen. Es kommt zur Signalübermittlung [10]. Die spezielle Hülle der Axone, die Markscheiden, werden durch Oligodendrozyten gebildet. Diese bilden Lamellen, die als Myelin bezeichnet werden. Je nach Vorkommen der Lamellen spricht man von markhaltigen oder marklosen Nervenfasern [37, S. 266].

1.6 Großhirn

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Das Hirngewicht beträgt bei Männern etwa 1350g und bei Frauen 1250g. Es untergliedert sich in mehrere Abteilungen: Rautenhirn (Rhombencephalon),

Mittelhirn (Mesencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon), Großhirn (Telencephalon) und Kleinhirn (Cerebellum). An der Oberfläche des Groß- und Kleinhirn findet sich die Großhirn- bzw. die Kleinhirnrinde (Cortex cerebri bzw. Cortex cerebelli), die *Graue Substanz*. Darunter liegt die *Weiße Substanz*, das Marklager (Corpus medullare) [10].

Die *Graue Substanz* ist nervenzellreich, die *Weiße* nervenfaserreich. Die Großhirnrinde gliedert sich von außen nach innen in folgende sechs Schichten: Lamina molecularis, Lamina granularis externa, Lamina pyramidalis externa, Lamina granularis interna, Lamina pyramidalis interna und die Lamina multiformis. In der Lamina pyramidalis interna kommen sehr große pyramidenförmige Nervenzellen vor (Längsdurchmesser 50–100 μm) [37, S. 710]. Diese Pyramidenzellen bilden mit 85 % die größte Klasse der in der Rinde vorkommenden Nervenzellen. Ihre Axone verlassen als Projektions-, Assoziations- und Kommissurenfasern die Rinde.

1.7 Kleinhirn

1.7.1 Anatomie

Das Kleinhirn liegt in der hinteren Schädelgrube. Es besteht aus zwei Hemisphären, die durch den Wurm, Vermis, miteinander verbunden sind. Die Oberfläche ist geprägt durch Furchungen, so dass Windungskuppen und -täler entstehen. Einige *Hauptfurchen* schneiden tief ein und gliedern dadurch Wurm und Hemisphären in sogenannte *Lappen*. Das Marklager zieht sich bis in die Windungskuppen hinein und wird dort auch Markzunge genannt.

Die Rinde ist im Durchschnitt 0,8 mm dick und besteht aus drei Schichten. Dem Mark benachbart ist das *Stratum granulosum*, dann folgt das *Stratum ganglionare* und direkt an der Oberfläche liegt das *Stratum moleculare*. Das Stratum granulosum ist sehr zellreich. Es enthält Nervenzellen in Form von Körnerzellen (Durchmesser 5 μm), Golgi-Zellen, Nervenfasern, Gliazellen und Glomeruli

cerebellares (GC). Letztere sind Gebiete komplexer Synapsen zwischen afferenten Fasern von Neuronen außerhalb des Kleinhirns (sogenannte Moosfasern) und Dendriten der Körnerzellen. Sie haben einen Durchmesser von etwa 20 μm. Die Afferenzen, die die Kleinhirnrinde erreichen, enden an den Purkinje-Zellen (PZ) in dem *Stratum ganglionare*. Die Axone der PZ sind Efferenzen der Kleinhirnrinde. Die Purkinje-Zellen sind die größten Zellen der Rinde mit einem Durchmesser von etwa 50 μm [37, S. 704]. Ihre Oberfläche ist von Synapsen mit den herantretenden Axonen bedeckt. Das *Stratum moleculare* bildet ein Synapsenlager. Es wird von Nervenfasern durchzogen, die untereinander unzählige Synapsen formen. Die Nervenzelldichte ist gering [10]. Die *Weiße Substanz* wird durch afferente Fasern und durch die von den Purkinje-Zellen stammenden efferente Fasern gebildet. Eingelagert in das Mark sind verschiedene Kleinhirnkerne, Ansammlungen von *Grauer Substanz*, u. a. der Nucleus dentatus [37, S. 706].

1.7.2 Funktion

Das Kleinhirn ist als eine Art Hilfsapparat dem Großhirn neben- und nachgeschaltet. Es erhält Informationen von peripheren Rezeptoren, integriert und koordiniert alle ihm zugeleiteten Erregungen und moduliert über seine Efferenzen die Motorik. Koordinationsstörungen und Störungen des Muskeltonus und des Gleichgewichts sind typische Symptome bei Kleinhirnläsionen [10].

1.8 Alkoholassoziierte Schäden am Kleinhirn

Eine Kleinhirnatrophie ist fast immer mit Alkoholismus assoziiert und stellt die häufigste Form der alkoholtoxischen Veränderung am Zentralen Nervensystem (ZNS) des Menschen dar. Mehrere Autoren [47, 59, 75] gehen davon aus, dass das Kleinhirn eine der empfindlichsten Regionen innerhalb des ZNS gegenüber der Noxe Alkohol überhaupt ist. Harper et al. [29] beschreiben allerdings in einer

jüngeren Studie aus dem Jahre 2003, dass chronischer Alkoholkonsum allein nicht unbedingt zu Kleinhirnschäden führen muss. Sobald aber Komplikationen im Zusammenhang mit dem Alkoholismus (wie das *WKS* und Leberschäden) auftreten, sind bereits deutliche neuropathologische Veränderungen zu sehen.

Die Angaben über das Vorliegen einer Kleinhirnatrophie bei Alkoholikern mit und ohne *WKS* liegen zwischen 26 und 40 % [15, 16, 21, 28]. Sie erscheint typischerweise nach etwa 10 oder mehr Jahren exzessiven Alkohokonsums [5]. Die genaue Ursache der Atrophie ist noch nicht ganz geklärt. Die Ähnlichkeit mit den Kleinhirnläsionen beim *WKS* jedoch lässt einen Zusammenhang mit dem mit Alkoholismus meist einhergehenden Thiamindefizit vermuten. Aber auch hier scheint Alkohol *per se* eine Schädigung auf die verschiedenen Zelltypen direkt auszuüben [2, 5, 21, 26].

Insgesamt wird das Ausmaß der Schädigungen der *Weißen Substanz* kontrovers diskutiert. Eine Reduktion ihres Volumens wird von mehreren Autoren beschrieben [2, 28, 29, 56]. Weder der Wassergehalt noch die chemische Struktur des Myelins sind verändert [45]. Die eindrucksvollen strukturellen Veränderungen der Rinde sollen allerdings ein besserer Indikator für alkoholbedingte Schädigungen darstellen als die undifferenzierte Reduzierung des des Marklagervolumens [61].

In der Rinde kommt es zu einem selektiven Neuronenverlust, zu Veränderungen der Dendritenaufzweigungen und zu einer Reduktion der Synapsenkomplexität [5, 54]. Tavares und Paula-Barbosa [75] konnten in einer tierexperimentellen Studie über das Kleinhirn nachweisen, dass je nach Dauer der Alkoholexposition die Anzahl der Körnerzellen, der Purkinje-Zellen und der Korbzellen reduziert sind. Die Zahl der Golgizellen bleibt stabil. Tavares et al. [76] verzeichnen einen Verlust an Synapsen zwischen PZ und Parallelfasern in der Molekularschicht.

Die Veränderungen an den Dendritenbäumen der PZ scheinen sehr komplex zu sein und werden unterschiedlich diskutiert. Harper [28] sowie Tavares et al. [73] finden eine Reduktion der Aufzweigungen, während Pentney [55] sowie Mann und Widmann [44] eine Vermehrung derselben verzeichnen, deren Ursache sie in

einem kompensatorischen Wachstum sehen.

Eine Regenerationsfähigkeit der Synapsen in der Kleinhirnrinde, d. h. eine bei Abstinenz wieder zunehmende Anzahl an Synapsen, wird in mehrere Studien tierexperimentell bewiesen [9, 59]. Dieses Vermögen der Synapsen, sich wechselnden äußeren Faktoren anzupassen, wird auch in einer weiteren Studie von Tavares und Paula-Barbosa [74] betont. Sie haben in einer elektronenmikroskopischen Studie an Rattenhirnen festgestellt, dass es innerhalb der Glomeruli cerebellares des *Stratum granulosum* bei Alkoholkonsum in Abhängigkeit von der Dauer desselben zu Umstrukturierungen kommt.

2. Fragestellung

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Kleinhirn besonders anfällig gegenüber einer chronischen Alkoholeinwirkung ist. Strukturelle Veränderungen in dem neuronalen Netzwerk sind bekannt (siehe Kapitel 1.8).
In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob sich Unterschiede im Kleinhirn von Alkoholikern (Gruppe 1) im Vergleich mit Nichtalkoholikern (Gruppe 2) im Sinne einer Reduktion der Synapsendichte und/oder einer Entmarkung mit Hilfe einer immunhistochemischen Technik lichtmikroskopisch erfassen lassen. Jeder einzelne Fall wurde auf zahlreiche, mit dem Alkoholismus häufig einhergehende Begleiterscheinungen (siehe Kapitel 1.3) untersucht, um den Verdacht auf einen Alkoholmissbrauch in der Gruppe 1 zu erhärten bzw. in der Gruppe 2 auszuschließen. Als Antikörper wurden *Anti-Synaptophysin* und *Anti-Myelin Basic Protein* benutzt. Die Auswertung erfolgte morphologisch semiquantitativ und planimetrisch.
Konkret sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein lichtmikroskopisch erfassbarer Unterschied in der Synapsendichte an den Purkinje-Zellen der Kleinhirnrinde zwischen den beiden Gruppen?

2. Besteht ein lichtmikroskopisch erfassbarer Unterschied in der Anzahl und Größe der Glomeruli cerebellares der Kleinhirnrinde zwischen den beiden Gruppen?

3. Besteht eine lichtmikroskopisch erfassbare Reduktion des Myelingehaltes im Kleinhirn in der Gruppe 1?

3. Material und Methoden

3.1 Fallmaterial

Das Fallmaterial entstammt dem Obduktionsgut des Rechtsmedizinischen Institutes der Universität zu Lübeck aus den Jahren 1990 bis 2000. Es wurden zwei Diagnosegruppen, Alkoholiker und Kontrollfälle, gebildet, deren Personaldaten sowie wesentlichen Anschlussdaten im Anhang in Tabelle A.1, A.2 und A.3 zusammengestellt sind (siehe S. 76 ff.).

Gruppe 1 (Alkoholiker)

Die Diagnose *Alkoholismus* wurde in 36 Fällen gestellt, u. a. anamnestisch durch Aussagen der Angehörigen, des Hausarztes oder der Nachbarn, die protokollarisch von der Kriminalpolizei festgehalten wurden. Diese Aussagen sind unter dem Begriff *vorhandene Alkoholanamnese* in der Tabelle zusammengefasst. Die Auffindesituation wurde ebenso in die Diagnosekriterien mit einbezogen (verwahrloste Wohnung, ungepflegte Erscheinung des Leichnams, Vorhandensein großer Mengen an Spirituosen, anderer Alkoholika oder leerer Flaschen). Die Ergebnisse der autoptischen Untersuchung des Leichnams im Rahmen der rechtsmedizinischen Begutachtung wie etwa der Nachweis von Fettleber, Leberzirrhose, Muskelatrophie, Ösophagusvarizen und die Höhe der Blutalkoholkonzentration (BAK) zum Zeitpunkt des Todes lassen sichere Rückschlüsse auf einen regelmäßigen, übermäßigen Alkoholkonsum zu. Nur in sechs Fällen gab es keine protokollierten Aussagen aus dem Umfeld des Toten. Hier gründet sich die Klassifizierung allein auf die Gesamtheit der Obduktionsbefunde und die Auffindesituation. In

keinem Fall jedoch standen eindeutige Aussagen zur täglichen Trinkmenge und zur Dauer des Alkoholismus zur Verfügung. Im Verlauf der Arbeit ergab sich die Überlegung, den Alkoholismus durch Nachweis von Ubiquitin in der Leber zu objektivieren. Ubiquitin ist ein Protein, welches u. a. in den Mallory-Körpern in der Leber vorkommt [79] (siehe auch Kapitel 3.2.1); Mallory-Körper sind spezifisch für alkoholbedingte Leberschäden [85].

Gruppe 2 (Kontrollfälle)

Die 40 Fälle dieser Gruppe waren laut Aussagen der Angehörigen und des Hausarztes und der Ergebnisse der rechtmedizinischen Untersuchungen vor Eintritt des Todes gesund und zeigten unter Berücksichtigung der obengenannten Kriterien keine Hinweise auf Alkoholismus. Der Tod trat plötzlich und unerwartet ein. Die BAK zum Zeitpunkt des Todes lag in allen Fällen unter 0,4 Promille.
Keine Berücksichtigung fanden hingegen Fälle mit folgenden Nebendiagnosen: chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Epilepsie oder Tumorleiden, Konsum von anderen Rauschmitteln wie etwa Morphin oder Marihuana, Medikamentenabhängigkeit, Schädel-Hirn-Trauma oder Fäulniserscheinungen.

Die beiden Gruppen wurden hinsichtlich des Alters (22 bis 50 Jahre, mittleres Lebensalter von 39 Jahren in der Alkoholikergruppe und 37 Jahren in der Kontrollgruppe) bestmöglich übereinstimmend gehalten, um eine Strukturgleichheit zu erzielen. 8 Frauen waren in der Alkoholikergruppe und 18 in der Kontrollgruppe. Die postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung betrug 24 bis maximal 120 Stunden, durchschnittlich 57 Stunden.

3.2 Präparative Aufarbeitung

Alle Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme bei der Obduktion in 4 %-igem gepufferten Paraformaldehyd fixiert. Die Fixierungszeit betrug mindestens

14 Tage und maximal 4 Wochen. Nach der Formalinfixierung erfolgte eine makroskopische Befunderhebung und die Entnahme von Gewebeproben für eine weiterführende mikroskopische Auswertung.
Das Gehirn wurde zusätzlich fotodokumentiert, bevor mindestens sieben Gewebeblöcke unterschiedlichster Topographie entnommen wurden. Am Kleinhirn wurde ein Parasaggitalschnitt auf Höhe der größten Ausdehnung des Nucleus dentatus entnommen. Das Gewebe wurde entsprechend üblicher Methoden in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden auf einem Schlittenmikrotom der Firma Jung AG (Fabriknummer 32059) in zwei verschiedenen Dicken ($5\,\mu$m und $10\,\mu$m) angefertigt. In allen Fällen erfolgte eine routinemäßige Befundung der inneren Organe in einer HE-Färbung. Die Leber aller Fälle wurde zusätzlich nach der Ubiquitin-Darstellung in Hinblick auf Mallory-Körper untersucht.

3.2.1 Immunhistochemische Reaktionen

Das Prinzip der Immunhistochemie lässt sich folgendermaßen erklären: Ein Primärantikörper bindet sich an ein spezifisches Epitop (die antigene Determinante der nachzuweisenden Struktur). Ein Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper. Es kann über mehrere Schritte, an deren Ende die Reaktion eines Antikörpers mit einem Farbstoff steht, die Expression eines bestimmten Epitops sichtbar gemacht werden [50]. Bei jedem einzelnen Reaktionsvorgang wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt. Das bedeutet, dass jedes Mal ein Schnitt mitgeführt wurde, der eine positive Expression bezüglich des gesuchten Epitops aufwies, während bei einem anderen Schnitt der Primärantikörper weggelassen wurde bei im übrigen gleicher Behandlung. Folgende Proteine wurden an Kleinhirnschnitten nachgewiesen: Synaptophysin und Myelin Basic Protein. Ubiquitin wurde an Leberschnitten nachgewiesen.

Nachweis von Synaptophysin

Es wurde ein polyklonaler Primärantikörper vom Schaf (The Binding Site, Code-Nr.PH510) verwandt. Dieser Antikörper richtet sich gegen Synaptophysin, ein Glykoprotein der Membran präsynaptischer Bläschen, die in allen Nervenendigungen vorkommen. Synaptophysin kann verlässlich und ohne Verlust auch in fixiertem Leichengewebe des Gehirns nachgewiesen werden [11]. Da es im ZNS nur in Synapsen enthalten ist, eignet es sich als Marker für eben diese [11, 34, 51, 83]. Daher wird in dieser Arbeit eine positive Immunreaktion mit *Anti-Synaptophysin* als Nachweis von Synapsen gedeutet. Auch Masliah et al. [48] gehen z. B. in einer Studie über die Neuropathologie des Gehirns bei der Alzheimer'schen Krankheit bei einer verminderten Immunreaktivität von Synaptophysin von einem Verlust an Synapsen aus. Außerhalb des Nervensystems ist Synaptophysin auch in neuroendokrinen Geweben und Neoplasien (z. B. Pankreas, Nebennierenmark) präsent [34, 83].

Die Gewebeschnitte wurden vor dem Färbevorgang zur Antigen-Demaskierung vorbehandelt, das heißt im vorliegenden Fall in Zitronensäure (ph-Wert 6,0) in der Mikrowelle erhitzt [42, 68, 80, 81]. Als Verstärkersystem wurde das *polyMICA* Detection Kit der Firma The Binding Site (Birmingham, Großbritannien, Code-Nr.: HK004.A) gewählt. *polyMICA* steht für polyclonal Mirror Image Complementary Antibodies. Das System arbeitet nach folgendem Prinzip: Verschiedene Antikörper reagieren nacheinander sowohl zunächst als Antikörper gegen den vorhergegangenen Antikörper als auch dann wiederum als Antigen für den nachfolgenden Antikörper. Dieses System bietet eine besonders hohe Sensitivität. Der Anti-Schaf Antikörper, Reagenz Nr. 4, ist konjugiert mit Meerrettich Peroxidase. Die Peroxidase bewirkt als Katalysator in einem letzten Schritt die Umwandlung des Chromogens (AEC) in ein farbiges Endprodukt. Dieses System erlaubt eine intensivere Anfärbung als andere Standardverfahren und hat eine besonders hohe Sensitivität.

Ein optimales Färbeergebnis wurde bei einer Schnittdicke von 5 μm und einer Verdünnung des Primärantikörpers mit Antikörperverdünner von 1:1000 erreicht. Im einzelnen wurde bei der Darstellung von Synaptophysin wie folgt vorgegangen:

1. Entparaffinieren und Rehydrieren: 3 x 10 min mit Xylol spülen, danach durch die absteigende Alkoholreihe (3 x 5 min 100 %-iger Alkohol, 1 x 5 min 96 %-iger Alkohol, 1 x 5 min 70 %-iger Alkohol und 2 min Aqua destillata)
2. 5 min spülen mit Tris-Puffer
3. Andauung in der Mikrowelle in 0,01 molarer Zitronensäure (ph 6,0) für 10 min bei 150 Watt
4. 10 min abkühlen bei Raumtemperatur
5. 5 min spülen mit Tris-Puffer
6. 10 min H_2O_2 zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität
7. 5 min spülen mit Tris-Puffer
8. 60 min Inkubation mit Primärantikörper bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer
9. 5 min spülen mit Tris-Puffer
10. 20 min Inkubation mit Reagenz Nr. 2 Polymika
11. 5 min spülen mit Tris-Puffer
12. 20 min Inkubation mit Reagenz Nr. 3 Polymika
13. 5 min spülen mit Tris-Puffer
14. 20 min Inkubation mit Reagenz Nr. 4 Polymika
15. 5 min spülen mit Tris-Puffer
16. Farbentwicklung mit AEC (Aminoethyl Carbazole Substrate Kit der Firma ZYMED, USA, Code-Nr. 11067520)
17. Abstoppen mit Aqua destillata
18. 3 min Gegenfärbung mit Hämalaun

19. 10 min fließend wässern mit Leitungswasser
20. Eindecken mit Aquatex

Nachweis von Myelin Basic Protein

Der polyklonale Primärantikörper vom Kaninchen (Firma DAKO, Hamburg, Code-Nr. A0623) richtet sich spezifisch gegen Myelin Basic Protein, welches den Hauptbestandteil der Markscheide darstellt. Itoyama et al. [33] verwenden in einer immunhistochemischen Studie diesen Antikörper und kommen zu dem Ergebnis, dass *Anti-Myelin Basic Protein* erfolgreich eingesetzt werden kann, um die Verteilung von Myelin im ZNS (inklusive Kleinhirn) zu beurteilen. Ein optimales Färbeergebnis wurde bei einer Schnittdicke von 10 μm und einer Verdünnung des Primärantikörpers mit Antikörperverdünner von 1 : 750 erzielt. Der biotinylierte Sekundärantikörper (Firma DAKO, Hamburg, Code-Nr. E 0353) wurde 1:300 verdünnt. Die Avidin-Biotin-Methode wurde hier angewandt, um die gesuchten Strukturen sichtbar zu machen. Diese Technik nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin: Ein vorgeformter Avidin-Biotin-Komplex reagiert mit dem biotinylierten Sekundärantikörpern [50].
Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

1. Entparaffinieren und Rehydrieren: 3 x 10 min mit Xylol spülen, danach durch die absteigende Alkoholreihe (3 x 5 min 100 %-iger Alkohol, 1 x 5 min 96 %-iger Alkohol, 1 x 5 min 70 %-iger Alkohol und 2 min Aqua destillata)
2. 5 min spülen mit Tris-Puffer
3. 10 min blocken in H_2O_2
4. 5 min spülen mit Tris-Puffer
5. 60 min Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer
6. 5 min spülen mit Tris-Puffer

7. 30 min Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer
8. 5 min spülen mit Tris-Puffer
9. 30 min Inkubation mit StreptABComplex (Firma DAKO, Hamburg, Code-Nr.:K 0377)
10. 5 min spülen mit Tris-Puffer
11. Farbentwicklung mit AEC Chromogen (Aminoethyl Carbazole Substrate Kit der Firma ZYMED, USA, Code-Nr. 11067520) unter mikroskopischer Kontrolle
12. Abstoppen der Farbentwicklung in Aqua destillata
13. 3 min Gegenfärbung mit Hämalaun
14. 10 min fließend wässern
15. Eindecken mit Aquatex

Nachweis von Ubiquitin

Ubiquitin ist ein Polypeptid, welches in allen eukaryoten Zellen vorkommt. Es ist gehäuft in den senilen Plaques im Gehirn bei der Alzheimerschen Krankheit, in den Lewy Körpern bei Parkinson und in den Mallory-Körpern bei alkoholischer Leberkrankheit zu finden. Vyberg und Leth [79] verwenden den Antikörper *Anti-Ubiquitin* in einer immunhistochemischen Studie und erklären, dass diese Methode äußerst sensitiv und spezifisch sei, um Mallory-Körper insbesondere bei alkoholischen Lebererkrankungen zu diagnostizieren (siehe auch [64, 85]).
In der vorliegenden Arbeit fand ein polyklonaler Primärantikörper vom Kaninchen (Firma DAKO, Hamburg, Code-Nr.: Z 0458) Anwendung. Ein optimales Färbeergebnis wurde bei einer Schnittdicke von 5 μm und einer Verdünnung des Primärantikörpers mit Antikörperverdünner von 1:800 erzielt. Der Sekundärantikörper (Firma DAKO, Code-Nr. E 0353) wurde 1:300 verdünnt. Als Färbemethode wurde die Avidin-Biotin-Methode ABComplex (Firma DAKO, Hamburg

Code-Nr. K 0355) gewählt, und es wurde im einzelnen genau wie unter den Punkten 1–15 bei dem Färbevorgang mit Myelin Basic Protein vorgegangen.

3.3 Quantifizierung

Voraussetzung für die Quantifizierung war eine standardisierte Färbemethode bei gleichdicken Schnitten. Vier Kriterien wurden ausgewertet:

1. Dichte der Synapsen an der Oberfläche einzelner Purkinje-Zellen (Immunreaktion: *Anti-Synaptophysin*)
2. Anzahl und Fläche der Glomeruli cerebellares im Stratum granulosum (Immunreaktion: *Anti-Synaptophysin*)
3. Grad des Myelingehaltes in verschiedenen Regionen des Kleinhirns (Immunreaktion: *Anti-Myelin Basic Protein*)
4. Korrelation der Expression von Synaptophysin und Myelin Basic Protein im Kleinhirn im Zusammenhang mit dem Nachweis von Mallory-Körpern in der Leber (Immunreaktion: *Anti-Ubiquitin*)

3.3.1 Dichte der Synapsen an den einzelnen Purkinje-Zellen

Die Dichte der Synapsen an den einzelnen Purkinje-Zellen (PZ) wurde semiquantitativ ausgewertet. Unter Lupenvergrößerung wurde ein geeigneter, gefäßarmer Gewebeausschnitt willkürlich gewählt, in dem keine anderen Strukturen angeschnitten waren. Mit einer Vergrößerung von 1000 wurden pro Präparat 100 PZ hinsichtlich des Farbniederschlags an der Oberfläche des Zellkörpers beurteilt, welcher aus Synapsen besteht und der in der Literatur als *boutons* beschrieben wird. Es wurden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, in denen im Kern der Nukleolus angeschnitten war (siehe Abbildungen 3.1 und 3.2). Dies sollte sicher-

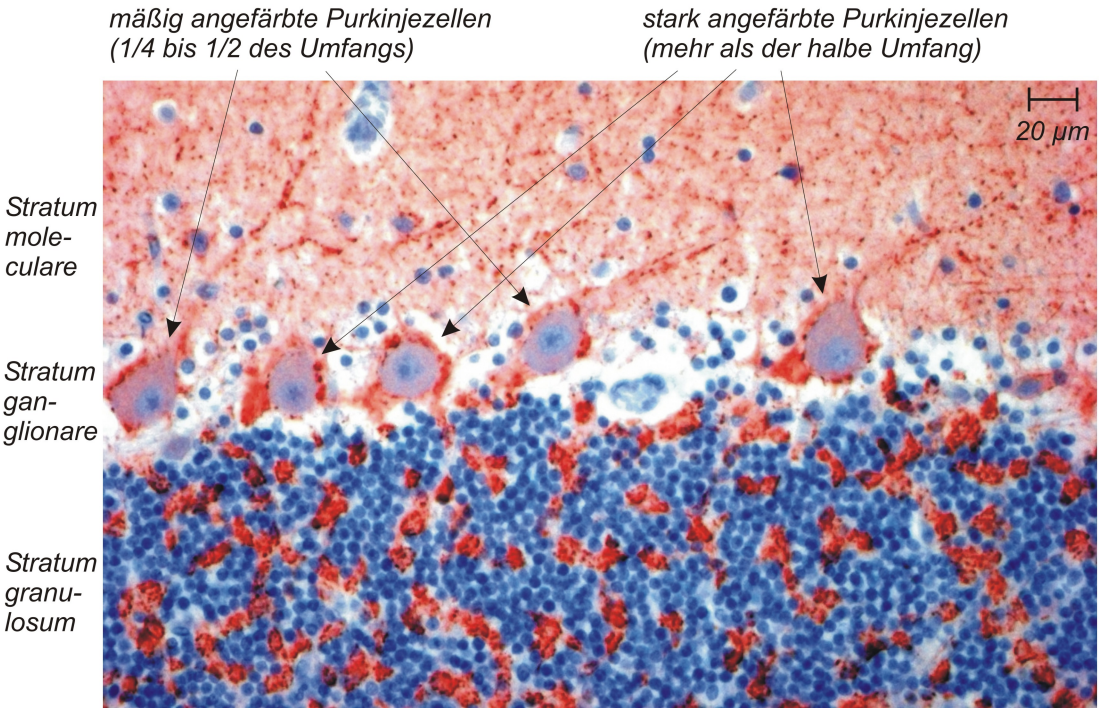

Abbildung 3.1: *Die drei Schichten der Kleinhirnrinde in einer Färbung mit Anti-Synaptophysin. Die Synapsen sind rot angefärbt. In jeder PZ sieht man den angeschnittenen Nukleolus (dunkelblau). Die PZ haben einen Durchmesser von etwa 25 µm.*[1]

stellen, dass nur die Zellen zur Auswertung gelangten, die einer mikroskopischen Schnittebene zuzuordnen waren. Der Objekttisch wurde manuell gleichmäßig in eine Richtung verschoben, im Zentrum immer die Purkinje-Zellschicht, so dass nur die Zellen einbezogen wurden, die aus einer zusammenhängenden Gewebeprobe stammen. Jede einzelne Zelle wurde einer von drei Klassifikationen zugeordnet, die den Grad des Farbniederschlags beschreibt: schwach, mäßig und stark.

Eine Zelle zeigte eine *schwache* Immunreaktion, wenn höchstens ein Viertel der Oberfläche, d. h. des Umfanges Synapsen enthielt. *Mäßig* bedeutet, dass der Farbniederschlag stärker ausfiel, dabei aber weniger als die Hälfte des Umfanges der

[1] Aufgrund der nicht ideal kugelförmigen Gestalt der PZ und der Tatsache, dass der Nukleolus nicht genau in der Mitte der Zelle liegt, ist ein gegenüber dem Literaturwert von 50 µm (siehe Kap. 1.7.1) kleinerer Wert für den Durchmesser in einem zweidimensionalen Anschnitt zu erwarten (nähere Erläuterung in Kap. 5.2.6).

Tabelle 3.1: *Semiquantitative Auswertung der Expression von Synaptophysin an den Purkinje-Zellen*

Farbniederschlag auf dem Umfang der PZ	Bewertung	Klasse
0 – 25 % des Umfangs angefärbt	schwach	3
26 – 50 % des Umfangs angefärbt	mäßig	2
51 – 100 % des Umfangs angefärbt	stark	1

PZ abgrenzte und *stark* bedeutet, dass mehr als der halbe Umfang einer Zelle einen Farbniederschlag aufwies (siehe Tabelle 3.1). Die Klasse, der die meisten PZ zugeordnet wurden, bestimmte die Klasse des gesamten Präparates bzw. Falles. Waren zwei Klassen gleich stark vertreten, galt die höhere Klasse. Es war fast immer eine eindeutige Verteilung innerhalb eines Präparates zu erkennen.
In Abbildung 3.2 wird beispielhaft gezeigt, wie der Farbniederschlag in dem Stratum ganglionare zu bewerten ist.

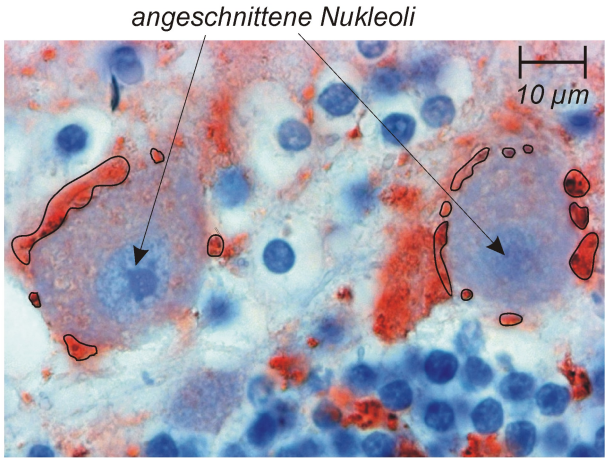

Abbildung 3.2: *Auswertung des Farbniederschlages in dem Stratum ganglionare, Ausschnitt aus Abb. 3.1. Umkreist sind die Ansammlungen von Synapsen an den Purkinje-Zellen (boutons). In dem Stratum granulosum erkennt man die GC als rote Inseln. Die linke PZ zeigt eine mäßig ausgeprägte und die rechte eine stark ausgeprägte Immunreaktion (siehe Tab. 3.1)*

3.3.2 Anzahl und Fläche der Glomeruli cerebellares

Die Anzahl und Fläche der Glomeruli cerebellares (GC), die in der Literatur als *Inseln* beschrieben werden, wurden mit Hilfe semiautomatischer planimetrischer Methoden bestimmt (IDMS, Interaktives Digitales Messsystem). Auf einem Digitalisiertablett wurde mit dem in das Mikroskop eingespiegelten Lichtpunkt des Cursors die GC umfahren, d. h. planimetriert. Die mikroskopische Vergrößerung allein betrug 1000 (Okular- x Objektivvergrößerung), während die eingespiegelte Messstrecke auf dem Digitalisiertablett auf insgesamt 2242 vergrößerte. Der an-

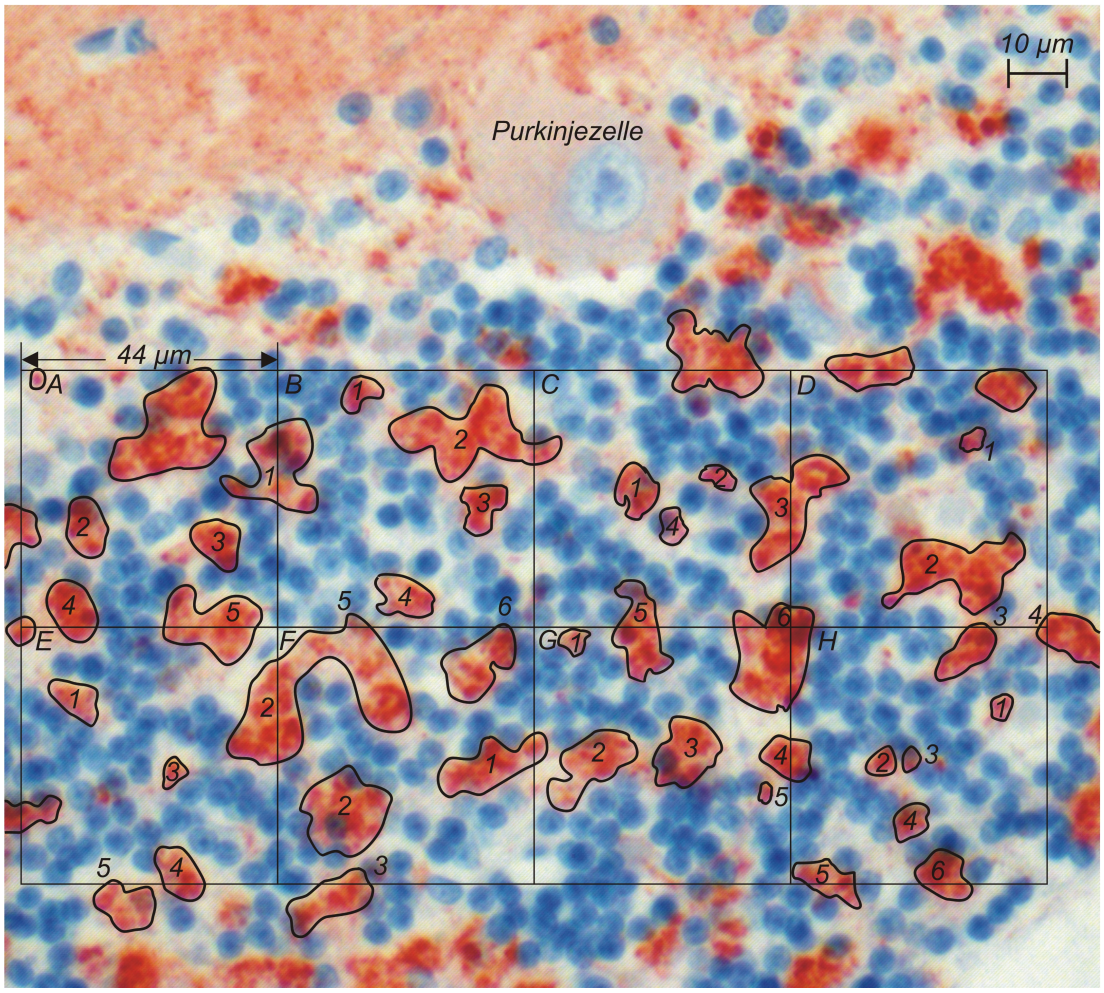

Abbildung 3.3: *Schematische Darstellung der Berechnung der Anzahl und Fläche der GC in einer Färbung mit Anti-Synaptophysin mit Hilfe von Messfeldern.*

geschlossene Rechner erlaubte mit *einem* Umfahren die gleichzeitige Speicherung mehrerer Parameter. Es wurden die Anzahl und der Flächeninhalt der GC für weitere Auswertungen gespeichert und entsprechend der Vergrößerung umgerechnet. Die GC wurden bei einer optischen Vergrößerung von 1000 vermessen. Über ein Zwischenspiel mit dem Digitalisiertablett ergab sich eine wahre Vergrößerung von 2242, d. h. ein Maßstab von 2242 : 1.

Pro Präparat wurden 20 Messfelder ausgewertet. Ein Messfeld (auf dem Digitalisiertablett 10 cm x 10 cm groß) entsprach bei der gewählten Vergrößerung einer wahren Fläche des Präparates von 44 μm x 44 μm. Bei Lupenvergrößerung wurde ein passendes Auswertungsgebiet nach dem Zufallsprinzip gewählt. Die Auswertung begann immer im oberen linken Abschnitt des im Okular sichtbaren Messfeldes. Unter dem Objektiv wurde der Schnitt mit dem Objektivtisch gleichmäßig manuell verschoben. Die Messfelder des Auswertungsgebietes grenzten unmittelbar aneinander [30]. Die am Messfeldrand oben und links liegenden sogenannten *verbotenen Linien* nach Gundersen sollen Doppelauswertungen verhindern (siehe Abbildung 3.3). Nach diesem Prinzip wurden GC, die auf jenen Linien lagen, nicht mit in die Auswertung einbezogen, während die auf den gegenüberliegenden Linien aber wohl einbezogen wurden [19]. In den Messfeldern B, C, F und G sind die GC durchnummeriert, die zur Auswertung gelangen. So wird z. B. das GC *B2* in Messfeld B gezählt, jedoch nicht in Messfeld C. In seltenen Fällen kann ein GC trotzdem zweimal gezählt werden. Ein Beispiel hierfür ist das GC *B5/E2*, das sowohl in Messfeld B als auch in E gezählt wird (nicht aber in F). Da dieser Fall wegen der besonderen Ausdehnung des GC über mehrere Messfelder sehr selten ist, wird er im Folgenden vernachlässigt.

3.3.3 Grad des Myelingehaltes

Der Grad des Myelingehaltes wurde anhand der Anfärbbarkeit der einzelnen Markfasern semiquantitativ ausgewertet (siehe Abbildung 3.4 und 3.5). Auch

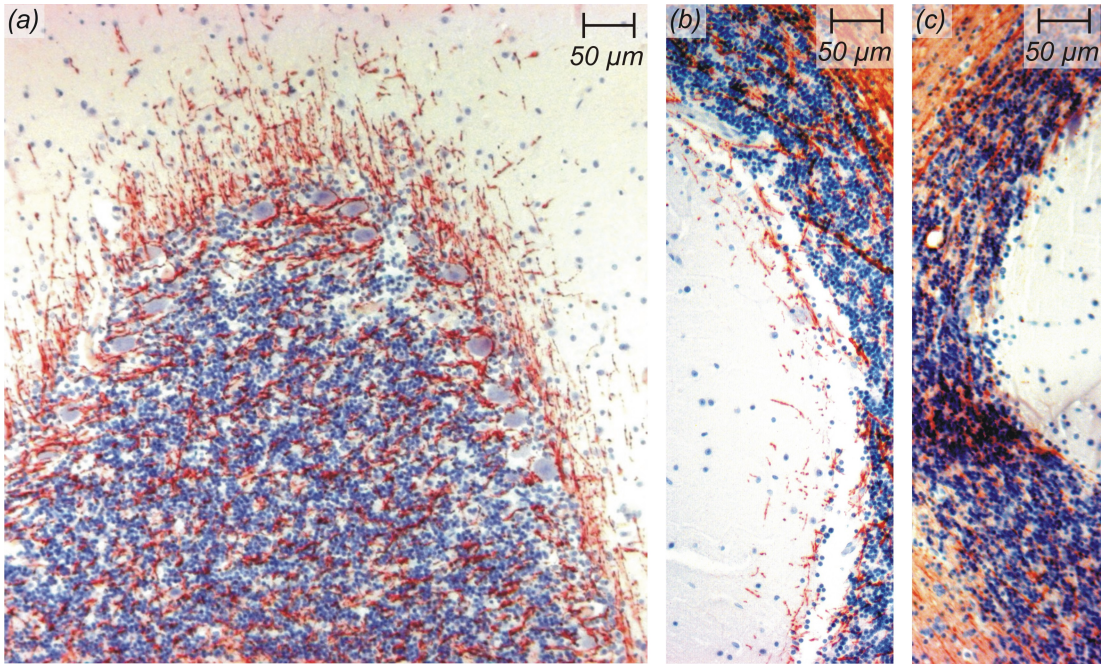

Abbildung 3.4: *Windungskuppe (a) und Windungstäler (b, c) der Kleinhirnrinde in einer Färbung mit Anti-Myelin Basic Protein. Die Markfasern sind rot angefärbt. (a) Sie ziehen dicht liegend durch das Stratum ganglionare in das Stratum moleculare hinein. Dieses Areal fällt in die Klasse 1. (b) Nur einzelne Markfasern verlaufen bis in die Molekularschicht (Klasse 2). (c) Die Markfasern sind nur bis zur PZ-Schicht nachweisbar (Klasse 3).*

hier wurde zunächst ein Gewebeausschnitt unter Lupenvergrößerung zufällig ausgewählt. Die weitere Auswertung wurde mit einer Vergrößerung von 1000 vorge-

Tabelle 3.2: *Semiquantitative Auswertung der Expression von Myelin Basic Protein in Höhe der Granulosazellschicht in Windungskuppen bzw. -tälern*

Farbniederschlag in der Granulosazellschicht	Bewertung	Klasse
vereinzelte Markfasern sind schwach angefärbt und nur bis zur PZ-Schicht nachweisbar	schwach	3
einzelne Markfasern sind gut angefärbt und verlaufen bis in die Molekularschicht	mäßig	2
dicht liegende angefärbte Markfasern ziehen deutlich bis in die Molekularschicht hinein	stark	1

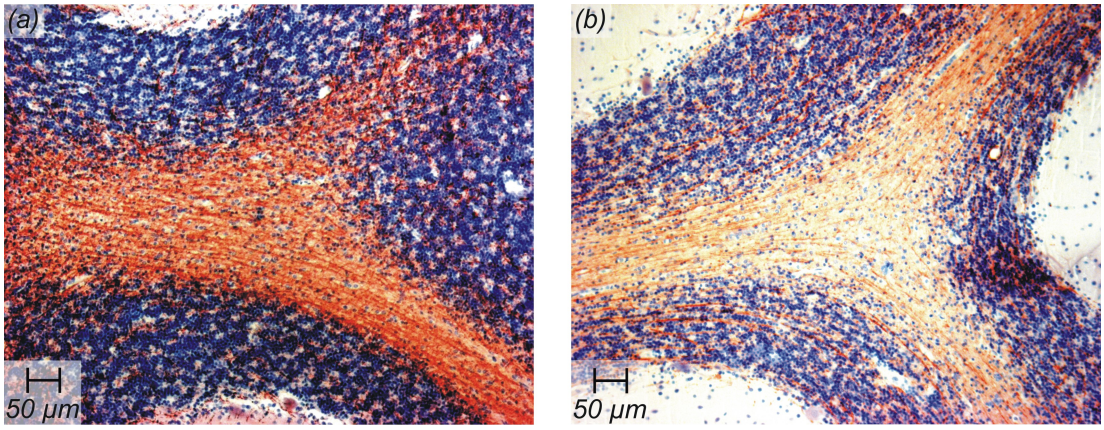

Abbildung 3.5: *Markzunge im Kleinhirn in einer Färbung mit Anti-Myelin Basic Protein. In (a) sind die Markfasern stark rot angefärbt und verlaufen dicht, dieses Areal fällt somit in die Klasse 1. In (b) sind einzelne Makfasern gut angefärbt, dieses Areal fällt in die Klasse 2 (siehe Tab. 3.3).*

nommen. In jedem Präparat wurden in drei verschiedenen Regionen des Kleinhirns (Windungskuppe, Windungstal und Markzunge) jeweils zehn Areale in Hinblick auf die Anfärbbarkeit mit *Anti-Myelin Basic Protein* beurteilt. Die semiquantitative Auswertung erfolgte entsprechend Tabelle 3.2 und 3.3. Die endgültige Klasse einer Region wurde bestimmt durch die Klasse, in die der höchste Prozentsatz der untersuchten 10 Areale fiel.

Tabelle 3.3: *Semiquantitative Auswertung der Expression von Myelin Basic Protein in den Markzungen*

Farbniederschlag in den Markzungen	Bewertung	Klasse
vereinzelte Markfasern sind schwach angefärbt	schwach	3
einzelne Markfasern sind gut angefärbt	mäßig	2
dicht liegende intensiv angefärbte Markfasern	stark	1

3.3.4 Nachweis von Mallory-Körpern

Die Leberpräparate aller Fälle wurden nach erfolgter immunhistochemischer Reaktion mit *Anti-Ubiquitin* hinsichtlich der Anwesenheit von Mallory-Körper untersucht. Sobald mehr als ein Mallory-Körper in einem Präparat nachgewiesen wurden, galt dieser Fall ohne weitere Differenzierung als *Ubiquitin positiv*.

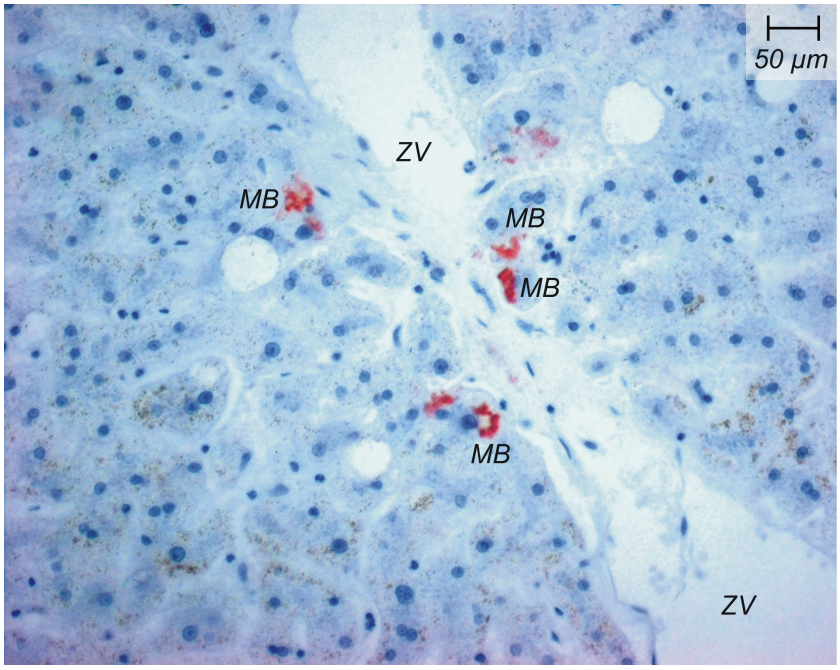

Abbildung 3.6: *Leberpräparat in einer Färbung mit Anti-Ubiquitin. Schräg durch die Mitte des Bildes verläuft eine Zentralvene (ZV). Die Mallory-Körper (MK) sind rot angefärbt und liegen intrazellulär. An dem unteren MK ist die typische, hufeisenförmig um den Nukleus angeordnete Lage sehr gut ersichtlich.*

3.4 Statistische Auswertung[2]

Die mittleren Hirngewichte in den beiden Gruppen wurden mit Hilfe des Zweistichproben-t-Test auf einen signifikanten Unterschied geprüft. Mit den durch

[2] Als Quelle wurde *Angewandte Statistik*, 7. Auflage, von Lothar Sachs [67] verwendet. Die Seitenzahlen in Klammern in diesem Kapitels beziehen sich auf dieses Werk.

Klassenbildung ermittelten Daten wurde der χ^2–*Test nach Pearson* und der *exakte Test nach Fisher* durchgeführt. Während der χ^2–*Test nach Pearson* allgemeingültig für eine Mehrfeldertafel ist, kann der *exakte Test nach Fisher* nur für eine klassische Vierfeldertafel angewandt werden [67, S. 449].
Die Auswertung erfolgte mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (EXCEL, Microsoft) und dem Statistikpaket von SPSS (SPSS für Windows, München).

3.4.1 Vergleich zweier Mittelwerte

Für die berechneten Mittelwerte des Hirngewichts werden Standardfehler angegeben. Als Schätzwert für den Standardfehler eines arithmetischen Mittelwertes $\bar{x}$ dient.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^{n} x_i\right)^2}{n(n-1)}} \tag{3.1}$$

Dabei bezeichnet s die Standardabweichung der Einzelwerte x_i und n gibt den Stichprobenumfang an [67, S. 159].
Für den Vergleich zweier Mittelwerte ungleicher Stichprobenumfänge ($n_1 \neq n_2$) benötigt man die Prüfgröße $\hat{t}$ für den sogenannten Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit ungefähr $FG = n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden. Bei unbekannten Varianzen, die möglicherweise ungleich sind, gilt [67, S. 355]

$$\hat{t} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \tag{3.2}$$

Überschreitet die Prüfgröße $\hat{t}$ die Signifikanzschranke der Student-Verteilung $t_{FG;\alpha}$, so gilt $\mu_1 \neq \mu_2$. Ist $\hat{t}$ kleiner als die Schranke, dann kann die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$ nicht abgelehnt werden.
Dieser Test ist bei zweiseitiger Fragestellung (d. h. H_0: $\mu_1 = \mu_2$, H_A: $\mu_1 \neq \mu_2$) und für nicht zu kleine und nicht zu unterschiedliche Stichprobenumfänge gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung bemerkenswert robust [67, S. 352].

3.4.2 Der χ^2-Test nach Pearson

Es sollen zwei Zufallsstichproben der Umfänge n_1 und n_2 auf Homogenität verglichen werden. Mehrere unterschiedliche Merkmale werden beobachtet, bzw. die beobachtete Ausprägung eines Merkmals wird in mehrere Klassen eingestuft.

	Klasse			Zeilensumme
	1	2	3	
Stichprobe 1	$k_{1,1}$	$k_{1,2}$	$k_{1,3}$	n_1
Stichprobe 2	$k_{2,1}$	$k_{2,2}$	$k_{2,3}$	n_2
Spaltensumme	m_1	m_2	m_3	n

Die Prüfgröße $\hat{\chi}^2$ misst dann die Abweichung der beobachteten Werte $k_{i,j}$ von den erwarteten Werten $\mu_{i,j}$

$$\hat{\chi}^2 = \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=1}^{2} \frac{(k_{i,j} - \mu_{i,j})^2}{\mu_{i,j}} \tag{3.3}$$

Die erwarteten Werte $\mu_{i,j}$ sind dabei durch die Randsummen gegeben

$$\mu_{i,j} = n_i \cdot \frac{m_j}{n},$$

so dass getestet wird, ob eine zu den Randsummen weitgehend proportionale Häufigkeitsverteilung vorliegt [67, S. 593]. Durch Umformen von Gleichung (3.3) erhält man

$$\hat{\chi}^2 = n \cdot \left(\sum_{i=1}^{3} \sum_{j=1}^{2} \frac{k_{i,j}}{n_i \cdot m_j} \right) - n \tag{3.4}$$

Die Prüfgröße $\hat{\chi}^2$ wird dann mit den tabellierten Werten für $\chi^2_{FG,\alpha}$ verglichen. Wegen der festgehaltenen Randsummen ist die Anzahl der Freiheitsgrade $FG = 2$.[3] Für kleine $2 \cdot c$–Feldertafeln ($c < 5$) müssen alle Erwartungshäufigkeiten $\mu_{i,j}$ mindestens gleich 2 sein [67, S. 581]. Dies ist für alle von uns untersuchten Mehrfelder-

[3] Die Anzahl der Felder einer $r \cdot c$–Tafel, für die man die Häufigkeiten frei wählen kann, wenn die Randsummen gegeben sind, ist $FG = (r-1) \cdot (c-1)$. Die Besetzungszahlen der übrigen Felder lassen sich durch Subtraktion ermitteln (siehe Sachs S. 594).

tafeln gegeben. Unter diesen Vorraussetzungen kann die Nullhypothese der Homogenität (d. h. beide Stichproben stammen hinsichtlich des untersuchten Merkmals aus der gleichen Grundgesamtheit) auf dem Signifikanzniveau α abgelehnt werden, wenn $\hat{\chi}^2 > \chi^2_{FG,\alpha}$ gilt.

Damit die Nullhypothese abgelehnt wird, muss also die Wahrscheinlichkeit, dass bei Gültigkeit der Nullhypothese ein Ergebnis eintritt mit einem χ^2–Wert, der mindestens der Prüfgröße $\hat{\chi}^2$ entspricht, kleiner sein als das gewählte Signifikanziveau:

$$P(\chi^2_{FG} \geq \hat{\chi}^2) < \alpha \tag{3.5}$$

3.4.3 Der exakte Test von Fischer

Das Verfahren vergleicht die Daten einer kleinen Stichprobe mit den möglichen Ergebnissen bei gleichen Randwerten einer Vierfeldertafel [67, S. 477]. Es werden also zwei Stichproben vom Umfang n_1 bzw. n_2 untersucht. Die Untersuchung unterscheidet zwischen zwei Merkmalen, dabei soll das Merkmal 1 in beiden Stichproben zusammen m-mal auftreten.

	Merkmal		gesamt
	1	2	
Stichprobe 1	k	$n_1 - k$	n_1
Stichprobe 2	$m - k$	$n_2 - m + k$	n_2
gesamt	m	$n - m$	n

Sei die Zufallsgröße X gegeben durch die Häufigkeit des Merkmals 1 in der Stichprobe 1. Unter der Annahme H_0, dass sich die beiden Grundgesamtheiten, aus denen die beiden Stichproben gezogen wurden, hinsichtlich der beobachteten Merk-

male nicht unterscheiden, gilt

$$P(X = k) = \frac{\binom{n_1}{k} \cdot \binom{n_2}{m-k}}{\binom{n}{m}}$$

Der Erwartungswert für das erste Merkmal in der ersten Stichprobe ist $\mu = n_1 \cdot \frac{m}{n}$. Beim zweiseitigen Test wird symmetrisch um den Erwartungswert herum ein Annahmebereich $A_{\text{zweiseitig}}$ gewählt, der die beobachtete Anzahl $\hat{k}$ gerade nicht enthält. Nur bei einem Signifikanzniveau $\alpha \geq 1 - P(A_{\text{zweiseitig}})$ kann die Nullhypothese H_0 abgelehnt werden.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben des Kleinhirnwurmes von Alkoholikern und Kontrollfällen, die routinemäßig im Rahmen der rechtsmedizinischen Untersuchung zwischen den Jahren 1990 und 2000 entnommen und asserviert wurden, in Hinblick auf morphologische Unterschiede untersucht. Durch intensives Studium der einzelnen Fallakten wurde sichergestellt, dass es sich in der Gruppe 1 um reine Alkoholiker handelte, d. h. es hat kein regelmäßiger Gebrauch oder gar eine Abhängigkeit von weiteren Drogen vorgelegen. Weitere toxische oder traumatische Einflüsse auf das Hirngewebe wurden sowohl bei ihnen als auch in der Kontrollgruppe ausgeschlossen.
Unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Färbereaktionen haben wir die *Weiße Substanz* und die Synapsendichte der Kleinhirnrinde bei Alkoholikern semiquantitativ lichtmikroskopisch erfasst und mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

4.1 Qualitative Auswertung

Die Färbereaktionen waren durchgehend hervorragend und eindeutig entsprechend obengenannter Klassen einzuteilen. Synaptophysin ließ sich wie erwartet in typischer Lokalisation und Form nachweisen [49, 51]. An der Oberfläche der Purkinje-Zellen zeigten die einzelnen Synapsen eine typische Immunreaktion (die *boutons*) ebenso wie in der Granulosazellschicht die Gebiete komplexerer Synapsen, die Glomeruli cerebellares (die *Inseln*). Auch in der Molekularschicht wies das Synapsenlager eine charakteristische Immunreaktion auf (die feinen roten

Pünktchen). Die Morphologie ist in Kapitel 1.7.1 beschrieben. Die Abbildungen 3.1 und 3.2 veranschaulichen die erzielten Immunreaktionen.
Die Myelin Basic Protein-positiven Strukturen zeigten einen deutlichen faserähnlichen Verlauf. Entmarkungsherde wurden jedoch nicht gefunden. Auffällig hingegen waren Unterschiede in dem Ausmaß des Farbniederschlages an einzelnen Fasern in der Markzunge und in Höhe der Granulosazellschicht. Daher wurden diese Unterschiede als zusätzliche Kriterien mit hinzugezogen.
Die Ubiquitin-positiven Strukturen fanden sich wie in der Literatur [69, 79] beschrieben im Zytoplasma einzelner Leberzellen (siehe Abbildung 3.6).

4.2 Quantitative Auswertung

Entsprechend der Arbeitshypothese sollte untersucht werden, ob ein lichtmikroskopisch erfassbarer Unterschied in der Kleinhirnrinde von Alkoholikern und Kontrollfällen in Bezug auf Synapsendichte und Myelingehalt besteht. Als zusätzliche Information über die Auswirkung von Alkohol am Gehirn haben wir das mittlere Hirngewicht in den beiden Gruppen ausgewertet und mit anderen Studienergebnissen verglichen.
Angaben über das Lebergewicht werden nur selten getroffen, da dieses zusätzlichen Einflüssen (Größe, Gewicht) unterliegt und auch von dem genauen Stadium der alkoholischen Lebererkrankung abhängt (von Fettleber über Fibrose zur Zirrhose ist das Gewicht sehr variabel) [8]. Hier haben Alter und Alkohol einen gegensätzlichen Effekt auf die Lebergröße: Alter vermindert, Alkohol vermehrt sie [69, S. 126].

Hirngewicht

Da das männliche Hirn durchschittlich 100 g schwerer ist als das weibliche, muss der Vergleich des mittleren Hirngewichts in der Alkoholikergruppe mit dem der Kontrollgruppe geschlechtsspezifisch durchgeführt werden.

Das mittlere Hirngewicht betrug bei den weiblichen Alkoholikern 1290 g ± 31 g[1] und bei den Frauen in der Kontrollgruppe 1349 g ± 22 g (siehe Tabellen A.1 und A.3). Mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests wird nun untersucht, ob der Mittelwertunterschied von 59 g auf dem 5 %-Niveau statistisch gesichert ist. Geprüft wird die Nullhypothese H_0: $\mu_1 = \mu_2$ gegen H_A: $\mu_1 \neq \mu_2$. Mit diesen Werten ergibt sich für die Prüfgröße nach Gleichung (3.2)

$$\hat{t} = \frac{59}{\sqrt{\frac{89^2}{8} + \frac{94^2}{18}}} = 1{,}53 < 2{,}06 = t_{24;\,0{,}05;\,zweis.}$$

Damit muss anhand der untersuchten Stichproben weiterhin davon ausgegangen werden, dass die Grundgesamtheit der weiblichen Alkoholiker dasselbe mittlere Hirngewicht hat wie die Grundgesamtheit der weiblichen Nichtalkoholiker.
Das mittlere Hirngewicht betrug bei den männlichen Alkoholikern 1436 g ± 25 g und bei den Männern in der Kontrollgruppe 1496 g ± 21 g. Auch dieser Unterschied ist ist auf dem 5 %-Niveau nicht signifikant ($\hat{t} = 1{,}81 < 2{,}01 = t_{48;\,0{,}05;\,zweis.}$).

4.2.1 Dichte der Synapsen an den einzelnen Purkinje-Zellen

Die Dichte der Synapsen wurde semiquantitativ analysiert. Jede einzelne Purkinje-Zelle ordneten wir einer von drei Klassen zu, die wir zu Beginn der Untersuchung genau definierten. 100 PZ wurden pro Fall ausgewertet. Die Klasse, der die meisten PZ zugeordnet wurden, bestimmte die Klassen des gesamten Falles.
Tabelle 4.1 zeigt die Verteilung der Klassen in den beiden Kollektiven. Einblick in die zugrundeliegenden Rohdaten gibt Tabelle A.4 im Anhang. Nach Gleichung (3.4) gilt $\hat{\chi}^2 = 1{,}626$. Daraus folgt $P(\chi_2^2 \geq \hat{\chi}^2) = 0{,}443 > 0{,}05 = \alpha$. Es gibt somit zwischen den beiden Kollektiven keinen signifikanten Unterschied in der Synapsendichte an den PZ.

[1] Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes berechnet nach Gleichung (3.1)

Tabelle 4.1: *Kreuztabelle – Klassenverteilung der Synaptophysin Expression an den Purkinje-Zellen. Die Anzahl der Fälle in den beiden Gruppen, wie sie den drei Klassen zugeordnet wurden, sind aufgelistet.*

	Klasse			Summe
	1 (stark)	2 (mäßig)	3 (schwach)	
Gruppe 1 (Alkoholiker)	16	5	15	36
Gruppe 2 (Kontrollgruppe)	14	10	16	40
Summe	30	15	31	76

4.2.2 Anzahl und Flächengröße der Glomeruli cerebellares

Die Anzahl und die Größe der Anschittsfläche der Glomeruli cerebellares wurden planimetrisch analysiert. Zugrundeliegende Daten für die weitere Auswertung sind aus Tabelle A.6 und Tabelle A.7 im Anhang ersichtlich.

Anzahl der Glomeruli cerebellares (Flächendichte)

Folgende Daten wurden automatisch noch durch das IDMS bestimmt — angegeben sind jeweils die Mittelwerte von allen Fällen einer Gruppe und die Standardabweichung der Mittelwerte nach Gleichung (3.1):

	Anzahl der gemessenen GC pro Präparates	Anzahl der GC pro Messfeld	Anzahl der GC pro mm^2
Alkoholikergruppe	106,3 ± 2,6	5,3 ± 0,1	2745 ± 68
Kontrollgruppe	112,2 ± 3,2	5,6 ± 0,2	2898 ± 83

Die Plausibilität der Werte der mittleren Spalte lässt sich anhand von Abbildung 3.3 überprüfen.

Größe der Anschittsfläche der Glomeruli cerebellares

In Abbildung 4.1 sind die Größenmediane der Glomeruli cerebellares eines Falles für die Gesamtheit der beiden Gruppen in Form von *Box-Plots* dargestellt. Die Werte der einzelnen Perzentilen sind im Anhang in Tabelle A.5 aufgeführt. Verglichen mit der Streuung der Größenmediane der einzelnen Fälle innerhalb einer Gruppe liegen die Gruppenmediane sehr nah beieinander. Somit ist davon auszugehen, dass sich die GC von Alkoholikern hinsichtlich ihrer Größe nicht von denen der Kontrollfälle unterscheiden.

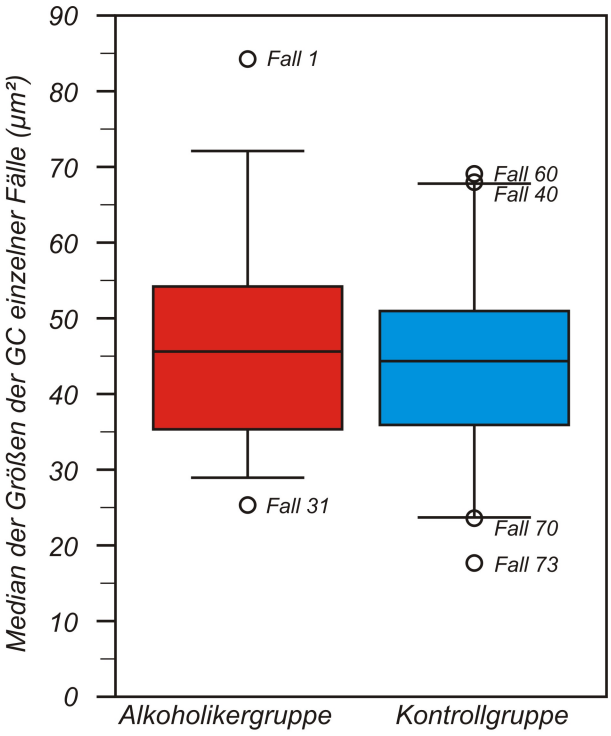

Abbildung 4.1: *Mediane der Flächeninhalte der Glomeruli cerebellares aller Fälle unterteilt nach Alkoholikern und Nichtalkoholikern. Die Höhe der Linie etwa in der Mitte der Box gibt den Median in der Gruppe an, die Box beinhaltet 50 % aller Größenmediane einer Gruppe und die obere Markierung entspricht 95 % der jeweiligen Gruppe, die untere Markierung 5 %. Die Fälle, die außerhalb dieser Grenzen liegen, sind gesondert eingezeichnet.*

Zusammenhang zwischen Größe und Dichte der GC

In Abbildung 4.2 ist die Anzahl der GC pro mm^2 für die Größenklassen mit einer Breite von 10 μm^2 aufgetragen. Berücksichtigt man die Fehlerbalken, die den 68 %-Vertrauensbereich der Flächendichten angeben (entsprechend der Tabelle A.7), so unterscheiden sich die beiden Kurven in ihrem Verlauf nicht wesentlich.

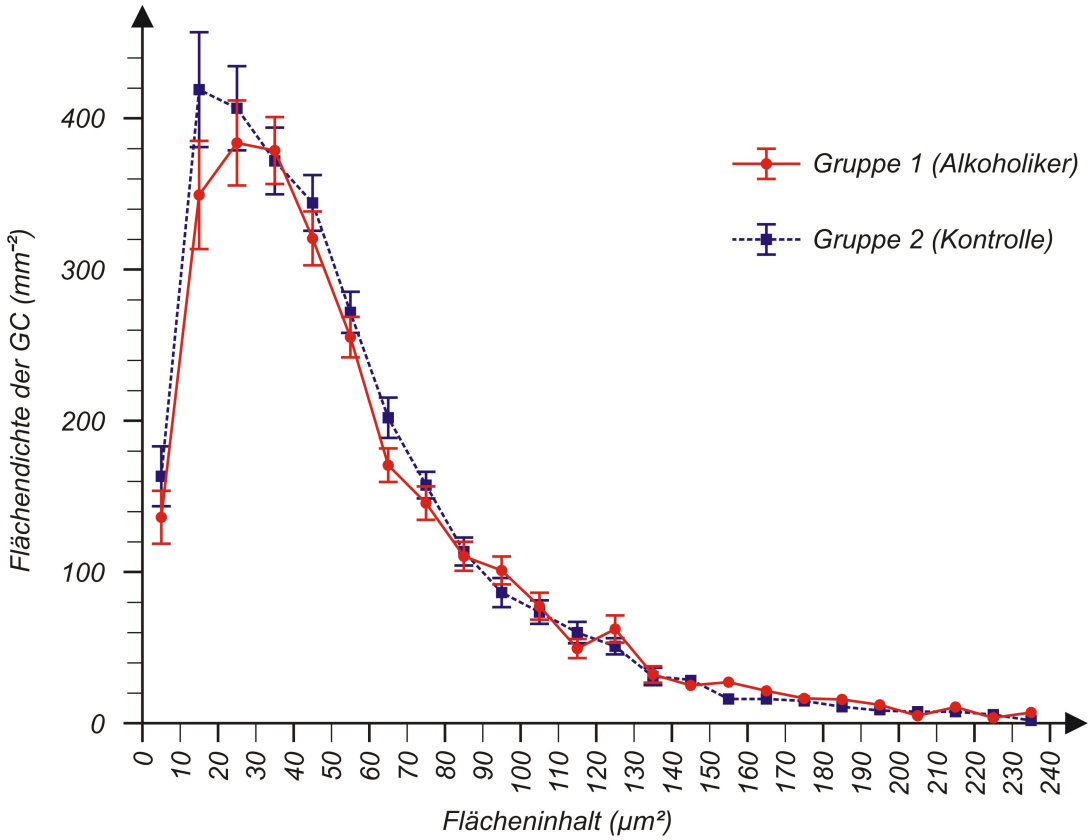

Abbildung 4.2: *Einander gegenübergestellt ist die Flächendichte der Glomeruli cerebellares (Anzahl der GC pro mm^2) in den Gesamtheiten der beiden Kollektive unterteilt nach Größenklassen (Klassenbreite 10 μm^2). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte entsprechend Tab. A.7 an. In jeder Gruppe sind nur 0,9 % aller GC größer als 240 μm^2.*

Die meisten GC haben eine Größe von 10 bis 40 μm^2. Das Diagramm 4.2 dient dazu, die beiden Kollektive in ihrer Gesamtheit einander gegenüber zu stellen; hier werden keine einzelnen Fälle beschrieben.

Abbildung 4.3 stellt dagegen den Zusammenhang zwischen der Größe der GC und ihrer Dichte für die einzelnen Fälle dar. Man erkennt auch in dieser Darstellung, dass die Gruppenmittel verglichen zur Streuung der einzelnen Fälle sehr nah beieinander liegen. Die Verteilung der Einzelfälle unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen nicht wesentlich. In der Kontrollgruppe gibt es für kleine Größenmediane (bis etwa 40 μm^2) eine größere Schwankung in der Flächendich-

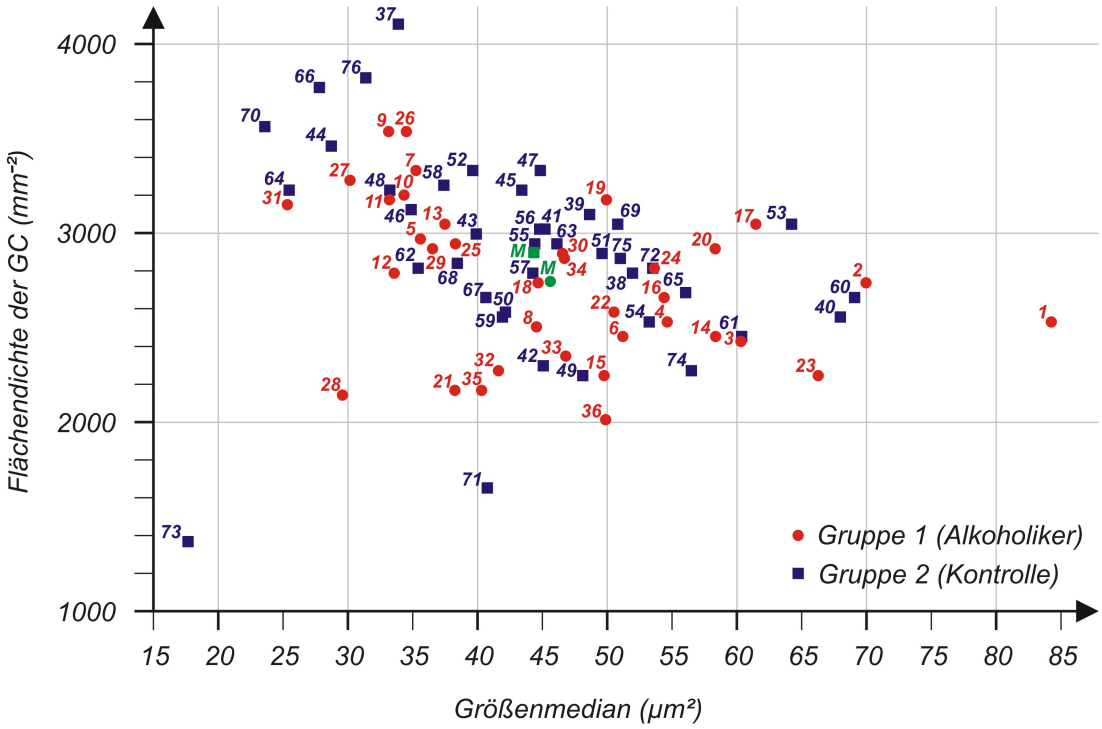

Abbildung 4.3: *Die einzelnen Fälle sind mit ihren Fallnummern eingetragen. Dargestellt ist der Größenmedian (Median der Flächeninhalte aller vermessenen GC eines Falles) gegen die Flächendichte der GC eines Falles. Mit einem grünen M sind die Gruppenmittel der beiden Gruppen bezeichnet (Gruppenmedian der Größenmediane; Gruppenmittelwert der Flächendichte).*

te als bei den Alkoholikern. So finden sich in diesem Bereich die beiden Fälle mit der kleinsten Flächendichte (Fall 71, 73) und die vier Fälle mit der größten Flächendichte (Fall 37, 66, 70, 76). Alle sechs Fälle gehören der Kontrollgruppe an. Für beide Gruppen gilt, dass Fälle mit überwiegend großen GC sich weniger in ihrer Flächendichte unterscheiden als Fälle mit überwiegend kleinen GC. In beiden Gruppen zeigt sich die leichte Tendenz, dass bei größerem Größenmedian die Flächendichte der GC abnimmt.

Auch hinsichtlich des Flächenanteils der GC unterscheiden sich die beiden Kollektive nur unwesentlich. Er beträgt in der Alkoholikergruppe 15,8 % und in der Kontrollgruppe 15,7 %

4.2.3 Grad des Myelingehaltes

Der Grad des Myelingehaltes wurde semiquantitativ analysiert (siehe Kapitel 3.3.3). Jeden einzelnen Fall ordneten wir hinsichtlich der Anfärbungsintensität in je drei verschiedenen Regionen der Kleinhirnrinde (Windungskuppe, Windungstal und Markzunge) einer von drei Klassen zu, die wir auch hier zu Beginn der Auswertung genau definierten. Die Ergebnisse der Färbereaktionen in Bezug auf die drei verschiedenen Regionen innerhalb eines Präparates waren mit Ausnahme eines Falles (Kontrollfall 43, siehe Tab. A.8) durchgehend unterschiedlich, d.h. es gab keine einheitliche *Anfärbeklasse* für *ein* Präparat. Eine Ursache hierfür ist der durchschnittlich höhere Myelingehalt in den Windungskuppen gegenüber dem der Windungstäler.

Die Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4 zeigen die Verteilung der Klassen in den verschiedenen Regionen in den beiden Kollektiven. Zugrundeliegende Rohdaten sind aus Tabelle A.8 im Anhang ersichtlich. Für die Expression von *MBP* in den Windungstälern gilt für beide Gruppen, dass die Klasse 1 (stark) nicht vertreten war. Die Anwendung des exakten Test nach Fischer ergibt nach Kapitel 3.4.3 für die Wahrscheinlichkeit des Annahmebereiches $P(A_{\text{zweiseitig}}) = 0{,}900$ und damit $\alpha = 0{,}05 < 0{,}10 = 1 - P(A_{\text{zweiseitig}})$. Die beiden Gruppen unterscheiden sich dies-

Tabelle 4.2: *Kreuztabelle – Klassenverteilung der Expression von MBP in den Windungstälern. Die Anzahl der Fälle in den beiden Gruppen, wie sie den drei Klassen zugeordnet wurden, sind aufgelistet.*

	Klasse			Summe
	1 (stark)	2 (mäßig)	3 (schwach)	
Gruppe 1 (Alkoholiker)	0	26	10	36
Gruppe 2 (Kontrollgruppe)	0	21	19	40
Summe	0	47	29	76

Tabelle 4.3: *Kreuztabelle – Klassenverteilung der Expression von MBP in den Windungskuppen. Die Anzahl der Fälle in den beiden Gruppen, wie sie den drei Klassen zugeordnet wurden, sind aufgelistet.*

	Klasse			
	1 (stark)	2 (mäßig)	3 (schwach)	Summe
Gruppe 1 (Alkoholiker)	25	7	4	36
Gruppe 2 (Kontrollgruppe)	21	13	6	40
Summe	46	20	10	76

bezüglich also nicht signifikant. Auch die Anwendung des χ^2-Test ergibt keinen signifikanten Unterschied ($\hat{\chi}^2 = 3{,}123$, $P(\chi_1^2 \geq \hat{\chi}^2) = 0{,}077 > 0{,}05 = \alpha$).
In der Expression von *MBP* in den Windungskuppen unterscheiden sich die beiden Gruppen ebensowenig signifikant. Nach Gleichung (3.4) gilt $\hat{\chi}^2 = 2{,}344$. Daraus folgt $P(\chi_2^2 \geq \hat{\chi}^2) = 0{,}310 > 0{,}05 = \alpha$.
Auch in der Expression von *MBP* in den Markzungen unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant. Es gilt $\hat{\chi}^2 = 0{,}358$ und daraus folgt $P(\chi_2^2 \geq \hat{\chi}^2) = 0{,}836 > 0{,}05 = \alpha$.

Tabelle 4.4: *Kreuztabelle – Klassenverteilung der Expression von MBP in den Markzungen*

	Klasse			
	1 (stark)	2 (mäßig)	3 (schwach)	Summe
Gruppe 1 (Alkoholiker)	12	15	9	36
Gruppe 2 (Kontrollgruppe)	15	14	11	40
Summe	27	29	20	76

Sowohl in den Windungstälern als auch in den Windungskuppen zeigt die Alkoholikergruppe im Mittel eine tendenziell stärkere Expression von *Anti-Myelin Basic Protein* als die Kontrollgruppe. Wir hatten eingangs eher einen umgekehrten Trend wenn nicht sogar einen signifikanten Unterschied erwartet. Eine mögliche Erklärung ist, dass es zu einem kompensatorischen Wachstum von markhaltigen Fasern in der Kleinhirnrinde bei Alkoholikern kommen kann, wie es andere Studien auch z. B. bei den Dendritenbäumen der PZ gefunden haben (siehe S. 17).

4.2.4 Nachweis von Mallory-Körper

Nur in 5 Fällen konnten anhand der Leberfärbung mit *Anti-Ubiquitin* Mallory-Körper nachgewiesen werden, das heißt, es konnte ein sicheres Kriterium (siehe Kapitel 1.3) für alkoholbedingten Leberschaden gegeben werden. Für eine weitere statistische Auswertung ist diese Anzahl jedoch zu gering. In der Kontrollgruppe zeigte erwartungsgemäß kein Fall eine Expression von *Anti-Ubiquitin*.

5. Diskussion

5.1 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit dem Schrifttum

5.1.1 Hirngewicht

Das durchschnittliche Hirngewicht der gesunden Frau liegt bei etwa 1250 g, beim gesunden Mann bei 1350 g. Die Daten hierzu schwanken erheblich, und es ist nicht genau geklärt, inwiefern die postmortalen Einflüsse und Fixierungsmethoden sich darauf auswirken.

In unserer Arbeit lag das mittlere Hirngewicht bei den weiblichen Alkoholikern bei 1290 g, bei den weiblichen Kontrollfällen bei 1349 g, bei den männlichen Alkoholikern bei 1436 g und bei den männlichen Kontrollfällen bei 1496 g. Das ergibt eine (statistisch nicht signifikante) Reduktion bei den Alkoholikerinnen von 59 g, bei den Alkoholikern von 60 g (siehe Seite 40).

In fast allen anderen Arbeiten werden nur männliche Alkoholiker und Kontrollfälle berücksichtigt, daher beziehen sich die im folgenden angegebenen Werte nur auf das durchschnittliche männliche Hirngewicht. Mehrere Studien finden eine leichte Reduktion des Hirngewichtes von Alkoholikern verglichen mit dem von Nicht-Alkoholikern, einige Arbeiten sehen aber gar keinen Unterschied bezogen auf das Gewicht [5]. Torvik [77] stellt eine Gewichtsreduktion von 31 g und Riethdorf [63] sogar eine von 90 g fest. Harper [22] beschreibt eine durchschnittliche Reduktion von 71 g, betont aber, dass hierbei auch ein Zusammenhang mit den Begleiterkrankungen wie z. B. der Leber bestehen kann und die Reduktion nicht

der direkten Alkoholtoxizität allein zuzuschreiben ist. Sie ist multifaktorieller Genese.

In einer weiteren Studie untersucht Harper [23] das spezifische Hirngewicht und stellt fest, dass es im Durchschnitt nur leicht reduziert ist und nicht der ursächliche Mechanismus für die Hirnatrophie sein kann. Dieser ist immer noch unbekannt. Die meisten Studien über die makroskopische Hirnatrophie bei Alkoholikern berufen sich allerdings nicht nur auf das Gewicht, sondern auch auf zusätzliche bildgebene Verfahren wie das MRT oder das CT. Die Atrophie des Gehirns wird anhand von Volumenverlust und Zunahme des pericerebralen Spaltes nachgewiesen [5, 22, 26, 66]. Dabei wird das Volumen des Gehirnes in Relation zu dem intrakraniellen Volumen gesetzt. Diese Methode bietet somit eine größere Verlässlichkeit als alleinige Volumenberechnungen.

5.1.2 Synapsen- und Myelingehalt des Kleinhirns

Schrifttum

Soweit die Literatur zu übersehen ist, wurde bisher keine zwischen Alkoholikern und Kontrollen vergleichende immunhistochemische Studie am Kleinhirn mit den Antikörpern *Anti-Synaptophysin* und *Anti-Myelin Basic Protein* durchgeführt. Diese beiden Antikörper werden in zahlreichen Arbeiten über das Zentrale Nervensystem unter anderen Gesichtspunkten aussagekräftig angewandt [11, 48, 68, 79]. Der Frage allerdings, in welcher Form verstärkter Alkoholkonsum sich auf verschiedene Strukturen des Klein- und Großhirns auswirkt, widmen sich zahlreiche Forschergruppen. Die meisten beziehen sich auf tierexperimentelle und elektronenmikroskopische Daten. Übereinstimmung besteht in der Tatsache, dass die Purkinje-Zellen des Kleinhirns die erste Zellgruppe sind, die von einer Neurodegeneration betroffen ist [2, 5, 60, 65]. Phillips et al. [60] beschreiben einen Verlust von 21 %, Torvik und Torp [77] verzeichnen eine Reduktion um 11–36 %. Beide Studien zeigen zudem eine Verminderung der Molekular- und

der Granulosazellschichtdicke. Phillips et al. kommen zu dem Ergebnis, dass die Molekularschicht die größte Reduktion erfährt.
Im Kleinhirn selber ist wiederum der Wurm von der Atrophie am stärksten betroffen [72]. Innerhalb des Wurmes sind die Schädigungen je nach Region sehr unterschiedlich. Der hintere, kaudale Lappen soll besonders betroffen sein [9, 24, 26, 77]. Harper und Kril [26] unterscheiden einerseits zwischen einer bereits makroskopisch erkennbaren Atrophie, hauptsächlich im vorderen, oberen Teil des Wurmes und andererseits einem Zellverlust, der im unteren Teil am ausgeprägtesten ist.

Synapsendichte

Dlugos und Pentney [9] fanden heraus, dass die Anzahl der Synapsen der Purkinjezelldendriten in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde von Ratten bei Alkoholkonsum reduziert ist. Die Synapsen wurden in elektronenmikroskopischen Bilder ausgezählt. Diese Reduktion bezieht sich allerdings nur auf den hinteren Lappen des Wurmes, der vordere bleibt davon offenbar unbeeinflusst. Jedoch zeigen sich auch bei den Kontrollfällen innerhalb der Molekularschicht *eines* Individuums Unterschiede in der Synapsendichte: Im hinteren Lappen ist sie signifikant größer als im vorderen. Diese Tatsache lässt Rückschlüsse über die komplexere Vernetzung der PZ in jenem Gebiet zu. Die PZ des hinteren Lappens interagieren mit einer größeren und vielfältigeren Menge an Afferenzen als die PZ des vorderen Lappens. Auch die Herkunft dieser Afferenzen ist verschieden. Diese Tatsache könnte auch ein Grund für eine mögliche größere Anfälligkeit dieses Areals auf äußere Einflüsse sein.
Fadda und Rossetti [15] hingegen sehen v. a. den vorderen Anteil des Wurmes von neuronaler Degeneration betroffen. Auch Phillips et al. [60] sowie Martin et al. [47] behaupten, dass der vordere Lappen des Wurmes die anfälligste Region des Kleinhirnes für alkoholbedingte Schädigungen sei. Martin et al. [47] beziehen sich dabei auf eine Studie von Baker et al. [2], in der aber keine Differenzierung

des Wurmes in seine unterschiedlichen Lappen getroffen werden. Insofern kann diese Aussage nicht nachvollzogen werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass nur wenige Autoren in ihren Studien über den Alkoholeinfluss auf den Kleinhirnwurm zwischen den beiden Lappen unterscheiden. Darüberhinaus widersprechen sich die Ergebnisse dieser Autoren.

In einem Übersichtsartikel aus dem Jahre 2004 [7] beschreiben die Autorinnen Dlugos und Pentney eine Studie, in der sie parallel zu elektronenmikroskopischen auch immunhistochemische Methoden mit dem Antikörper *Anti-Synaptophysin* anwendeten, um Aussagen über die Synapsendichte der Molekularschicht und das Ausmaß des Synapsenverlustes durch Alkohol zu treffen. Sie finden eine große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden. Die immunhistochemische Methode erbrachte im Gegensatz zu der elektronenmikroskopischen keinen signifikanten Unterschied in der Synapsendichte.

Für dieses Phänomen führen die Autorinnen zwei mögliche Ursachen an. Einerseits wurden in der immunhistochemischen Arbeit die beiden Lappen des Wurmes nicht einzeln ausgewertet und es wurde dadurch eine mögliche Reduktion im hinteren Lappen durch die normale Anzahl im vorderen „maskiert“, während für die elektronenmikroskopische Arbeit ausschließlich Gewebeproben aus dem hinteren Lappen des Wurmes verwandt wurden. Andererseits ermöglicht die elektronenmikroskopische Methode eine direkte Quantifizierung der Synapsen, wohingegen in der immunhistochemischen Reaktion mehrere Moleküle der Antikörpern die gesuchte Struktur markieren und das genaue Mengenverhältnis nicht herauszufinden ist bzw. die Wiedergabe nicht 1:1 ist.

Phillips et al. [60] untersuchen in einer Studie die drei Schichten der Kleinhirnrinde und kommen zu dem Schluss, dass die Schicht mit einem hohen Synapsenaufkommen, die Molekularschicht, unter Alkoholeinfluss die größten Veränderungen in Form einer Reduktion verzeichnet. Diese betreffen v. a. die Dicke der Schicht, aber auch die Dichte der Purkinjezellen. Die untersuchten Gewebeproben stammen aus gerichtsmedizinischen Autopsien und wurden lichtmikroskopisch ausge-

wertet.

Tavares et al. [76] stellen in ihrer elektronenmikroskopischen Studie an Rattenhirnen aus dem Jahr 1987 heraus, dass die Synapsen der Molekularschicht auf den toxischen Effekt von Alkohol mit strukturellen Veränderungen, einer Reduktion ihrer Anzahl sowie mit einer Zunahme des Volumens reagieren (siehe auch [75]). Die Autoren deuten dies als eine Art der Kompensationsfähigkeit, die aber nicht dazu ausreicht, die auf der Kleinhirnatrophie basierenden funktionellen Defizite bei chronischem Alkoholismus zu auszugleichen. Diese Kompensationsfähigkeit spielt auch eine Rolle bei der Betrachtung der Glomeruli cerebellares, die zwar eine Umstrukturierung unter Alkoholeinfluss erfahren, deren Anzahl an Synapsen jedoch nicht reduziert ist [74]. Es wurden keine weiteren Studien über die Glomeruli cerebellares gefunden.

In unserer Arbeit konnte lichtmikroskopisch mit Hilfe des Antikörpers *Anti-Synaptophysin* Synapsen in der Kleinhirnrinde zuverlässig und wie in der Literatur beschrieben dargestellt werden. Weitere quantitative Untersuchungen und statistische Auswertungen zeigten jedoch weder in der Anzahl und Größe der Glomeruli cerebellares noch in der Synapsendichte an den Purkinje-Zellen einen Unterschied zwischen Alkoholikern und Kontrollfällen.

Myelingehalt

Rintala et al. [65] zeigen in ihrer Studie an Rattenhirnen lichtmikroskopisch durch direktes Ausmessen der Schichtdicken der Kleinhirnrinde, dass die *Weiße Substanz* keinen Verlust erfährt und somit die resistenteste Region des Kleinhirns in Bezug auf alkoholinduzierte Schäden ist.

Phillips [61] stellt in einer Studie an Mäusen fest, dass die *Weiße Substanz* sehr wohl in ihrem Volumen reduziert ist, aber keine solchen herrausragenden strukturellen Veränderungen erfährt wie die *Graue Substanz*. Er stellt folgende bemerkenswerte Berechnung auf: Wenn 20 % der PZ bei Alkoholismus zugrunde

geht, dann erwartet er einen Verlust an Axonen des Marks von 5 % erwartet werden (die zugrundeliegenden Zahlen hat er anderen Studien entnommen). Verluste von diesem geringen Ausmaß sind jedoch nicht mithilfe planarer Auswertungen zu erkennen.

Auch Harper [28] sieht den Untergang von Neuronen als eine Ursache der Degeneration von Axonen. Zum anderen gibt es nach seinen Studien auch einen direkten toxischen Einfluss von Alkohol auf das Myelin, mit einer beobachtbaren Reduktion der *Weißen Substanz*.

Baker [2] kommt in seiner Studie an menschlichen Gehirnen aus forensischem Gut zu dem Ergebnis, dass die *Weiße Substanz* eine Reduktion erfährt, die aber an das Ausmaß des klinischen Erscheinungsbildes gekopppelt ist. Er findet bei ataktischen Alkoholikern eine Reduktion von bis zu 42 % (siehe auch [29, 45]).

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die *Weiße Substanz* bei Alkoholismus reduziert ist. Im Großhirn lässt sich die Reduktion sowohl makroskopisch durch bildgebende Verfahren als auch lichtmikroskopisch in Form von *Entmarkungsherden* nachweisen [69, S. 482]. Auch im Kleinhirn zeigen bildgebende Verfahren eine Reduktion auf makroskopischer Ebene. Diese Reduktion ist jedoch auf mikroskopischer Ebene nicht eindeutig geklärt (s. o.).

In der vorliegenden Arbeit konnten lichtmikroskopisch mit Hilfe des Antikörpers *Anti-Myelin Basic Protein* keine *Entmarkungsherde* der *Weißen Substanz* bei Alkoholikern nachgewiesen werden. Auch in dem *Stratum ganglionare* der Kleinhirnrinde wurde keine Reduktion des Myelingehaltes im Vergleich mit der Kontrollgruppe festgestellt.

5.2 Kritische Betrachtung von Einzelaspekten

5.2.1 Fallmaterial

Im rechtsmedizinischen Patientengut sind klinische und anamnestische Daten meist sehr limitiert. Zudem müssen die begrenzten Möglichkeiten einer retrospektiven Studie unweigerlich kritisch betrachtet werden. Unter Stellung strenger Kriterien haben wir die Fälle ausgesucht (siehe Kapitel 3.1). Jedoch fehlen weitere klinische Angaben wie z. B. Vorliegen psychomotorischer Defizite, einer Ataxie oder eines beginnenden *Wernicke-Korsakow-Syndroms*, über kognitive Fähigkeiten und detaillierte Daten über Dauer und Intensität des Alkoholmißbrauchs in der Gruppe der Alkoholiker, um einen Zusammenhang zu den neuropathologischen Befunden herzustellen. Dass ein Zusammenhang existiert, wird von den meisten Autoren bestätigt. Nur wenige Studien [21, 69, 70] stellen heraus, dass das Ausmaß der mittels CT und MRT nachweisbaren Kleinhirnatrophie nicht streng mit der klinischen Symptomatik korreliert. In der Gruppe der Kontrollfälle gehen wir durch Erfüllung unserer oben gestellter Kriterien davon aus, dass kein Alkoholmissbrauch vorgelegen hat.

Ein vermehrter Alkoholkonsum, der die von uns untersuchten Strukturen des Kleinhirns beeinflusst hat, ohne andere Organsysteme zu schädigen, könnte in Einzelfällen trotzdem stattgefunden haben. Diese Ausnahmefälle können jedoch wegen der Größe der Fallzahl, die im Vergleich zu anderen neuropathologischen Studien über den Alkoholeinfluss auf das Kleinhirn positiv hervorzuheben ist, vernachlässigt werden. Die große Anzahl von Fällen bietet eine gute Basis für die statistische Auswertung.

5.2.2 Präparative Aufarbeitung

Einen nur schwer abschätzbaren Einfluss auf die Immunreaktion von Geweben stellt die Fixierung dar. Das gebräuchlichste Fixierungsmittel ist Formalin, wel-

ches nach einer längeren Fixierungszeit zu einer zunehmenden „Maskierung“ der gesuchten Antigene führt [82]. Die Fixierungsdauer sollte daher generell maximal nur ein paar Tage betragen. Diese Vorgabe ist jedoch bei einer korrekten neuropathologischen Befundung von Gehirnen nicht einzuhalten – besonders nicht in einer retrospektiven Studie – da diese „im Ganzen“ in Formalin fixiert sein müssen und Formalin in 24 Stunden nur wenige Millimeter tief in das Gewebe eindringt.

Durch eine Gewebevorbehandlung, wie in den hier durchgeführten Untersuchungen durch enzymatische Andauung und Mikrowellenbehandlung, kann die Antigen-Maskierung unterbrochen werden. Es existiert jedoch keine Methode, um die Maskierung objektiv zu quantifizieren. Aus den genannten Gründen müssen diese potentiellen Fehlerquellen, die aber alle Gehirne gleichermaßen betreffen, unberücksichtigt bleiben. Zudem systematisierten und optimierten wir durch umfangreichen Vorarbeiten die einzelnen Schritte der Färbemethoden, um zusätzliche methodische Einflüsse zu vermeiden [1, 14, 80, 81, 82].

Der ultrastrukturelle Zustand des Gehirngewebes verschlechtert sich durch Autolyse mit Zunahme der postmortalen Liegezeit, dem Zeitraum zwischen Tod und Fixierung. In einer Arbeit aus dem Jahre 1991 kann Eggers et al. [12] jedoch zeigen, dass Synapsen relativ resistent diesen Einflüssen gegenüber sind. Masliah et al. [49] finden heraus, dass eine Postmortalzeit von über 8 Stunden und eine Fixierungszeit von über 3–4 Wochen in Formalin die Immunreaktivität beeinträchtigen. Nach Sillevis Smitt et al. [71], deren Färbetechnik der unseren ähnlicher als jene ist, hat eine postmortale Liegezeit von bis zu 24 Stunden, eine Fixierungszeit bis zu 6 Wochen und die Lagerung in Paraffinblöcken bis zu 20 Jahren kaum einen Einfluss auf die Immunreaktivität. In einer jüngeren Studie kommen Wester et al. [82] zu dem Ergebnis, dass auch die Dauer der Lagerung in Paraffinblöcken einen negativen Einfluss auf die Immunreaktivität von Geweben hat und weisen darauf hin, dass man in wissenschaftlichen Arbeiten auf gleichartig behandelte Gewebeproben achten sollte.

Es gibt mehrere Studien, die explizit den Einfluss von Fixierung, Lagerung und Mikrowellenbehandlung auf das Ergebnis bei immunhistochemischen Färbemethoden mit dem Antikörper *Anti-Synaptophysin* beschreiben und keinen entscheidenden Einfluss bei einer postmortalen Liegezeit von bis zu 120 Stunden und einer Formalinzeit von bis zu vier Wochen sahen [32, 49, 68, 71].

Auch für die von uns untersuchten Fälle ist kein Einfluss der postmortalen Liegezeit zu erkennen. So zeigt Abbildung 5.1 keine nennenswerte Korrelation zwischen postmortaler Zeitspanne bis zur Fixierung und dem Größenmedian der GC. Dasselbe gilt für die Flächendichte und den Flächenanteil der GC.

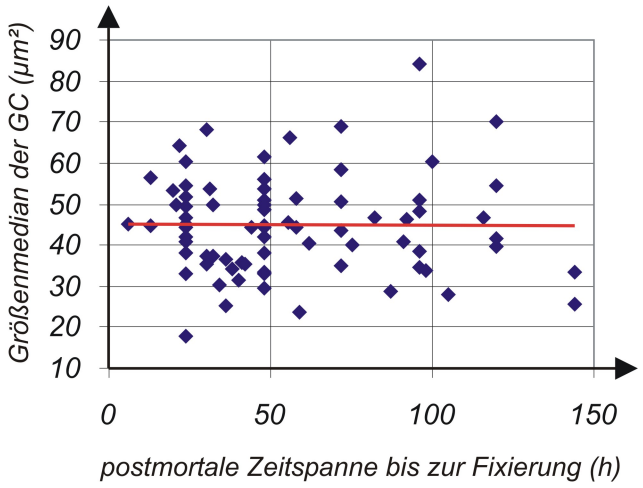

Abbildung 5.1: *Es sind die Größenmediane der GC für alle Fälle gegen die postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung des Gehirns aufgetragen. Die Regressionsanalyse führt zu der roten Gerade:* $y = -0{,}003 \cdot x + 45{,}06$. *Für den Korrelationskoeffizienten gilt* $r^2 = 0{,}00007$.

5.2.3 Geschlechterverteilung

Die Geschlechterverteilung konnte zwischen den beiden Gruppen leider nicht gleich gehalten werden. Der Frauenanteil unter den Alkoholikern unseres Patientengutes macht knapp ein Viertel aus. Hansen und Simonsen [20] finden in ihrer Arbeit über Todesfälle bei Alkoholikern unter rechtsmedizinischen Fällen eine typische Verteilung von einem Drittel Frauen zu zwei Dritteln Männern heraus.

In der Kontrollgruppe haben wir über die Hälfte weibliche Patienten. Dies ist allein auf die Besonderheiten eines rechtsmedizinischen Patientengutes zurück-

zuführen. Es war uns nicht möglich, die Geschlechterverhältnisse in den beiden Gruppen anzunähern, da wir eine möglichst große Fallzahl erzielen wollten und uns zudem eine Altersbegrenzung wichtiger erschien.
Es gibt kaum Arbeiten, die den toxische Effekt von Alkohol auf das Gehirn in Abhängigkeit von dem Geschlecht untersuchen. Die meisten beziehen sich ausschließlich auf männliche Alkoholiker. In CT Studien werden aber bei Frauen dieselben Auswirkungen des Alkoholismus wie bei Männern nachgewiesen, allerdings schon bei kürzerer oder nicht so intensiver Alkoholanamnese [26, 44]. Daraus lässt sich schließen, dass das weibliche Gehirn empfindlicher auf die Toxizität von Alkohol reagiert als das männliche.
In einer jüngeren Veröffentlichung aus dem Jahr 2003 geht Hommer [31] dieser Hypothese nach und stellt verschiedene Studien einander gegenüber. Er kommt zu dem Schluss, dass sich diesem Thema bisher nur zwei Arbeitsgruppen gewidmet haben, die auch noch zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen. Er selbst findet nämlich einen größeren alkoholinduzierten pathologischen Befund bei weiblichen Trinkern als bei männlichen, wohingegen Pfefferbaum et al. [57] keinen Unterschied feststellen.

5.2.4 Alkohol und Alter

In der Literatur wird auch der Zusammenhang von Alter und Alkoholeffekt am Gehirn diskutiert. Die neuropathologischen Befunde bei älteren Alkoholikern sind größeren Ausmaßes als die bei jüngeren. Eine Theorie besagt, dass es zu einer kummulativen Toxizität im Alter kommt, wohingegen eine andere Erklärung von einer größeren Vulnerabilität des alternden Gehirnes ausgeht, unabhängig von der Dauer und Intensität des Alkoholismus [44, 54, 56, 65].
Die Altersbegrenzung für die Auswahl unserer Fälle entspricht der üblichen (20–50 Jahre), d. h. in allen mir vorliegenden Arbeiten über das menschlichen Kleinhirn bei Alkoholikern wurde genauso verfahren.

Innerhalb dieser Altersspanne ist auch bei unseren Fällen kein Einfluss des Alters zu erkennen. So zeigt Abbildung 5.2 keine nennenswerte Korrelation zwischen dem Alter und dem Größenmedian der GC.

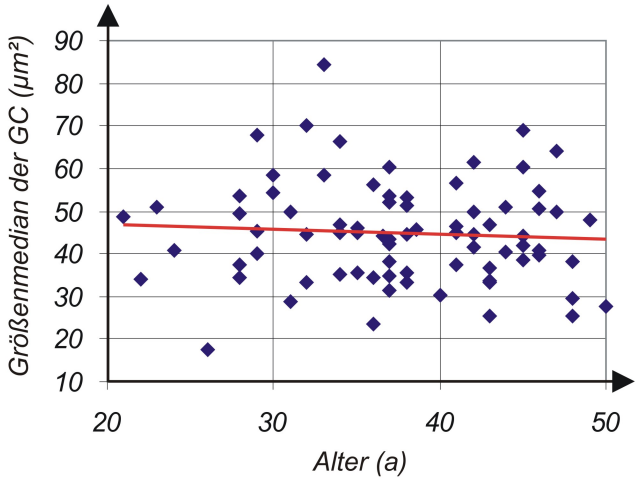

Abbildung 5.2: *Es sind die Größenmediane der GC für alle Fälle gegen das Alter der Personen aufgetragen. Die Regressionsanalyse führt zu der roten Gerade:* $y = -0{,}115 \cdot x + 49{,}20$. *Für den Korrelationskoeffizienten gilt* $r^2 = 0{,}0045$.

5.2.5 Lokalisation der Gewebeproben

Die Gewebeproben aus dem Kleinhirnwurm, die wir für unsere Arbeit verwendeten, stammen aus den Jahren 1990–2000 und können retrospektiv nicht sicher einem bestimmten Lappen zugeordnet werden. Es wurde jedoch in allen Fällen identisch verfahren; ein Parasaggitalschnitt wurde ungefähr auf Höhe der größten Ausdehnung des Nucleus dentatus vorgenommen, um aus dieser Region eine Gewebeprobe zu entnehmen. Das Literaturstudium zeigte, dass in einigen Studien strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Lappen des Kleinhirnwurmes beschrieben werden. Allerdings widersprechen sich die Ergebnisse dieser Forschergruppen zum Teil, so dass es keinen allgemeinen Konsens zu dieser Thematik gibt (siehe 5.1.2).

5.2.6 Dreidimensionalität

Ergebnisse morphometrischer Studien an histologischen Schnitten sind aufgrund der dreidimensionalen Gestalt und Orientierung der Zellen sowie Schrumpfungsartefakten nicht einfach zu interpretieren [6].
Die Literatur gibt grössere Werte für die PZ und die GC an als wir in unserer Arbeit herausfanden. Zudem widersprechen sie sich zum Teil und die Messmethode wird nicht näher erläutert [10, 37, 60].
Bei der Bildwiedergabe der PZ ist zu beachten, dass es sich jeweils um die Querschnitte dieser eher ellipsoiden Strukturen in Höhe des Nukleolus handelt und nicht in Höhe der größten Ausdehnung der Zelle. Bei den Berechnungen und Abbildungen der GC ist zu berücksichtigen, dass diese Strukturen eine komplizierte Form ausfüllen (siehe Abbildung 3.3). Zudem kann *ein* GC durch die geringe Dicke des Präparates bedingt auch mehrfach angeschnitten sein. Diese Faktoren beeinflussen die Auswertung sicherlich und man erzielt auf diese Weise automatisch kleinere Durchschnittsflächen als es in Wirklichkeit in Höhe des größten Radius ist. Aber auch hier gilt, dass alle Präparate in gleicher Weise davon betroffen sind.

5.2.7 Mallory-Körper

Das Hinzuziehen einer weiteren immunhistochemischen Färbung der Leber zum Nachweis von Mallory-Körpern sollte ein weiteres Indiz für den stattgefundenen Alkoholmissbrauch sein. Nur fünf Fälle der Alkoholikergruppe zeigten jedoch diese MK, so dass für den Großteil der Alkoholiker eine Objektivierung auf diese Weise nicht möglich war.
Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl positiver Fälle dürfte u. a. die Tatsache sein, dass sich Mallory-Körper bei Entzug, z. B. kurz vor dem Tod, nicht immer nachweisen lassen können [69].

5.3 Ausblicke

Bei unserer Thematik bietet es sich an, dieselbe Methode bei einem Kollektiv an Alkoholikern anzuwenden, zu dem mehr klinischen Daten zur Verfügung stehen. Fragen zur Konsumgewohnheit und Dauer, zu Abstinenzphasen, zu psychomotorischen Defiziten und zu sowohl psychischen als auch physischen Auffälligkeiten müssten beantwortet werden. Dieses war in unserem Rahmen nicht gegeben.
Der eventuell unterschiedliche Einfluss von Alkohol auf die beiden Lappen des Kleinhirnwurmes ist in zukünftigen Studien zu beachten. In diesem Zusammenhang wäre eine Gegenüberstellung beider Lappen von demselben Patientengut von großem Interesse.
Begleitende elektronenmikroskopische Studien könnten die Ergebnisse absichern, wie es ansatzweise in der Arbeit von Dlugos und Pentney (siehe S. 52) erfolgt ist.
Tierversuche zur Frage von alkoholinduzierten Hirnschäden unterscheiden sich stark bezüglich der verwendeten Tiere und der Dauer und Art der Alkoholzufuhr. Aufgrund dieser Diskrepanzen ist es schwierig, die Ergebnisse einzelner Studien miteinander zu vergleichen. Die Entwicklung eines standardisierten Modells müsste angestrebt werden (siehe auch [44]). Zudem ist es unklar, ob und wie weit Ergebnisse aus Tierexperimenten auch auf den Menschen übertragbar sind [18].

6. Zusammenfassung

Durch Alkoholismus induzierte stukturelle Veränderungen im neuronalen Netzwerk des Kleinhirns sind lange bekannt und Objekt zahlreicher Studien. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich eine Reduktion der Synapsendichte und des Myelingehaltes bei Alkoholikern durch eine geringere Expression von ausgewählten Oberflächen-Antigenen lichtmikroskopisch nachweisen lässt.

36 Alkoholiker wurden unter strengen Kriterien aus dem Patientengut des Institutes für Rechtsmedizin ausgewählt und 40 Kontrollfällen gegenübergestellt. Die Klassifizierung der Fälle basierte auf der Auswertung der rechtsmedizinischen Akten. In allen Fällen war eine detaillierte Aussage über den Gesundheitszustand und den stattgefundenen Alkoholkonsum möglich.

Als Studienmaterial dienten formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem Bereich des Kleinhirnwurmes, so wie sie routinemäßig in dem Institut für Rechtsmedizin angefertigt werden. *Anti-Synaptophysin* und *Anti-Myelin Basic Protein* kamen als Antikörper auf 5 μm bzw. 10 μm dicken, selbstangefertigten Schnitten zum Einsatz. Die immunhistochemischen Methoden entsprachen üblichen Standards.

Die einzelnen Fälle wurden in Hinblick auf die Dichte der Synapsen an den Purkinje-Zellen, die Größe und Anzahl der Glomeruli cerebellares im *Stratum granulosum* und den Myelingehalt sowohl der Markzungen als auch der Kleinhirnrinde in Höhe des *Stratum ganglionare* untersucht. Die Auswertung erfolgte sowohl semiquantitativ als auch planimetrisch.

Es zeigte sich, dass die von uns gewählte Methode sehr gut geeignet ist, die ge-

nannten Strukturen zu kennzeichnen und quantitativ auszuwerten. Die einzelnen Immunreaktionen fielen deutlich unterschiedlich aus. Der Vergleich der beiden Kollektive zeigte jedoch in Bezug auf die untersuchten Merkmale keine signifikanten Unterschiede. Die Synapsendichte an den Purkinje-Zellen unterschied sich nicht wesentlich zwischen den beiden Gruppen. Der Größenmedian der Glomeruli cerebellares (GC) betrug in der Alkoholikergruppe 45,61 μm^2 und in der Kontrollgruppe 44,34 μm^2. Pro Messfeld wurden bei den Alkoholikern 5,3 und bei den Kontrollfällen 5,6 GC gezählt. Das bedeutet, dass auch in Größe und Anzahl der GC kein signifikanter Unterschied bestand. Auch in Bezug auf den Myelingehalt im Bereich der Markzungen und in Höhe des *Stratum ganglionare* zeigte sich bei der semiquantitativen Auswertungen kein aussagekräftiger Unterschied zwischen der Alkoholikergruppe und der Kontrollgruppe.

Der Zusammenhang von Alkoholkonsum und der Synapsendichte bzw. dem Myelingehalt des Kleinhirns wird in der Literatur konträr diskutiert. So verhindert möglicherweise die erhebliche individuelle Schwankungsbreite in Bezug auf den neuronalen Aufbau des Kleinhirns einen statistisch fassbaren Unterschied zwischen den beiden Kollektiven bei Anwendung der hier beschriebenen Methoden. Weiterführende Studien könnten unter Einbeziehung ausführlicherer klinischer Daten die Fälle möglicherweise noch nuancierter klassifizieren. Da die neuronale Struktur des Kleinhirnwurmes regional inhomogen zu sein scheint und es Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber alkoholtoxischen Einflüssen gibt, müsste hier topographisch differenziert werden.

Literaturverzeichnis

[1] **Arnold MM, Srivastava S, Fredenburgh J, Stockard CR, Myers RB, Grizzle WE:**
Effects of Fixation and Tissue Processing on Immunohistochemical Demonstration of Specific Antigens.
Biotech Histochem 71, 224–230 (1996)

[2] **Baker KG, Harding AJ, Halliday GM, Kril JJ, Harper CG:**
Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy.
Neuroscience 91 (2), 429–438 (1999)

[3] **Bourne JA:**
Handbuch 1 der Immunperoxidase Färbemethoden.
DAKO Diagnostika (1983)

[4] **Bühringer G et al.:**
Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen in Deutschland.
Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit, Band 128 (2000)

[5] **Charness ME:**
Brain lesions in alcoholics.
Alcohol Clin Exp Res 17(1), 2 – 11 (1995)

[6] **Coggeshall RE:**
A consideration of neural counting methods.
TINS 15 (1), 9 – 13 (1992)

[7] **Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J:**
Alcohol-induced neurodegeneration: where, when and why?
Alcohol Clin Exp Res 28(2), 350 – 364 (2004)

[8] **Denk H, Stumtner C, Fuchsbichler A, Zatloukal K:**
Alkoholische und nichtalkoholische Steatohepatitis.
Pathologe 22, 388 – 398 (2001)

[9] **Dlugos CA, Pentney RJ:**
Morphometric Evidence That The Total Number Of Synapses On Purkinje Neurons Of Old F344 Rats Is Reduced After Long-Term Ethanol Treatment And Restored To Control Levels After Recovery.
Alcohol Alcohol 32(2), 161 – 172 (1997)

[10] **Drenckhahn D, Zenker W:**
Benninghoff Anatomie, Bd. 2, Kap. 16, S. 246
Urban und Schwarzenberg, 15. Auflage (1994)

[11] **Eastwood SL, Burnet PWJ, Harrison PJ:**
Altered Synaptophysin Expression As A Marker of Synaptic Pathology In Schizophrenia.
Neuroscience 66(2), 309 – 319 (1995)

[12] **Eggers R, Knebel G, Haug H:**
Morphometrische Untersuchungen zur biologischen Alterung der Synapsen im menschlichen Nucleus caudatus.
Z Gerontol 24, 302 –305

[13] **Emsley R:**
Alcohol and brain damage.
SAMJ 83(3), 164b (1993)

[14] **Evers P, Uylings HBM:**
Effects of microwave pretreatment on immunocytochemical staining of vibratome sections and tissue blocks of human cerebral cortex stored in formaldehyd fixative for long periods.
J Neurosci Methods 55, 163 – 172 (1994)

[15] **Fadda F, Rossetti ZL:**
Chronic ethanol consumption: From neuroadaption to neurodegeneration.
Prog Neurobiol 56(4), 385 – 431 (1998)

[16] **Feuerlein W:**
Alkoholismus – Mißbrauch und Abhängigkeit.
Thieme, 4. Auflage (1989)

[17] **French SW:**
Mechanisms of alcoholic liver injury.
Can J Gastroenterol. 14(4), 327 – 32 (2000)

[18] **Freund G, Ballinger WE:**
Loss of synaptic receptors can precede morphologic changes induced by alcoholism.
Alcohol Alcohol Suppl 1, 385 – 391 (1991)

[19] **Gundersen HJ:**
Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect.
J Microsc 111, 219 – 223 (1977)

[20] **Hansen AU, Simonsen J:**
The manner and cause of death in a forensic series of chronic Alcoholics.
Forensic Science International 49, 171 – 178 (1991)

[21] **Harper CG:**
Neuropathology of brain damage caused by alcohol.
Med J Aust 2, 6, 276 – 282 (1982)

[22] **Harper CG, Kril JJ, Holloway RL:**
Brain shrinkage in chronic alcoholics: a pathological study.
Br Med J 290, 501 – 504 (1985)

[23] **Harper CG, Kril JJ, Daly JM:**
The specific gravity of the brains of alcoholic and control patients: a pathological study.
Br J Add 82, 1349 – 1354 (1987)

[24] **Harper CG:**
Brain damage and alcohol abuse: where do we go from here?
Br J Add 83, 613 – 615 (1988)

[25] **Harper CG, Kril JJ:**
Patterns of neuronal loss in the cerebral cortex in chronic alcoholic patients.
J Neurol Sci 92, 81 – 89 (1989)

[26] **Harper CG, Kril JJ:**
Neuropathology of alcoholism.
Alcohol Alcohol 25(2-3), 207 – 216 (1990)

[27] **Harper CG, Kril JJ:**
Neuropathological changes in alcoholics. In: Hunt WJ, Nixon SJ (eds) Alcohol-induced brain damage.
US Department of Health and Human Services, Washington DC, 39 – 69 (1993)

[28] **Harper CG:**
The Neuropathology of Alcohol-specific Brain Damage, or Does Alcohol Damage the Brain?
J Neuropathol Exp Neurol 57(2) 101 – 110 (1998)

[29] **Harper CG, Dixon G, Sheedy D, Garrick T:**
Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre
Pr Neuro Psych 27, 951 – 961 (2003)

[30] **Haug H:**
Stereological methods in the analysis of neuronal parameters in the central nervous system.
J Microsc 95, 165 – 180 (1972)

[31] **Hommer DW:**
Male and female sensitivity to alcohol-induced brain damage.
Alcohol Research Health 27(2), 181 –185 (2003)

[32] **Hoog A, Gould VE, Grimelius L, Franke WW, Falkmer S, Cheifec G:**
Tissue Fixation Methods Alter the Immunohistochemical Demonstrability of Synaptophysin.
Ultrastruct Pathol 12, 673 – 678 (1988)

[33] **Itoyama Y, Sternberger NH, Kies MW, Cohen SR, Richardson EP, Webster H:**
Immunocytochemical Method to Identify Myelin Basic Protein in Oligodendroglia and Myelin Sheaths of the Human Nervous System.
Ann of Neurol 7, 157 – 166 (1980)

[34] **Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P:**
A 38,00-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles.
Proc Natl Acad Sci USA 82, 4137 – 4141 (1985)

[35] **Jensen GB Pakkenberg B:**
Do alcoholics drink their neurons away?
Lancet 342, 1201 – 1204 (1993)

[36] **Joyce EM:**
Aetiology of alcoholic brain damage: Alcoholic neurotoxicity or thiamine malnutrition?
Br Med Bull 50(1) 99 – 114 (1994)

[37] **Junqueira LC, Carneiro J:**
Histologie
Springer, 4. Auflage (1996)

[38] **Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H:**
The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics.
Neuroscience 79(4), 983 – 998 (1997)

[39] **Kril JJ, Halliday GM:**
Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned?
Prog Neurobiol 58(4), 381 – 387 (1999)

[40] **Lishman WA:**
Alcohol and the Brain.
Br J Psychiatry 156, 635 – 644 (1990)

[41] **Lundqvist C, Volk B, Knoth R, Alling C:**
Long-term effects of intermittend versus continuous ethanol exposure on hippocampal synapses of the rat.
Acta Neuropathol 87, 242 – 249 (1994)

[42] **Macintyre N:**
Unmasking antigens for immunohistochemistry.
Br J Biomed Sci 58(3), 190 – 196 (2001)

[43] **Mallach HJ, Hartmann H, Schmidt V:**
in: Alkoholwirkung beim Menschen.
Thieme, 1. Auflage (1987)

[44] **Mann K, Widmann U:**
Zur Neurobiologie der Alkoholabhängigkeit.
Fortschr Neurol Psychiatr 63(6), 238 – 247 (1995)

[45] **Mann K, Agartz I, Harper C, Shoaf S, Rawlings RR, Momenan R, Hommer DW, Pfefferbaum A:**
Neuroimaging in alcoholism: Ethanol and braindamage.
Alcohol Clin Exp Res 25(5), 104 – 109 (2001)

[46] **Mann K:**
Weltkongress für Alkoholforschung in Mannheim.
Dtsch Arztebl 102(20), 1223 – 1224 (2005)

[47] **Martin, PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S:**
The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease.
Alcohol Res Health 27(2), 134 – 142 (2003)

[48] **Masliah E, Terry RD, Deteresa RM, Hansen LA:**
Immunohistochemical quantification of the synapse – related protein synaptophysin in Alzheimer disease.
Neurosci Lett 103, 234 – 239 (1989)

[49] **Masliah E, Terry RD, Alford M, Deteresa R:**
Quantitative Immunohistochemistry of Synaptophysin in Human Neocortex: An Alternative Method to Estimate Density of Presynaptic Terminals in Paraffin Sections.
J Histochem Cytochem 38(6) 837 – 844 (1990)

[50] **Naish SJ:**
Handbuch 2 der Immunperoxidase Färbemethoden.
DAKO Diagnostika (1989)

[51] **Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P:**
Protein p38: An Integral Membrane Protein Specific for Small Vesicles of Neurons and Neuroendocrine Cells.
J Cell Biol 103, 2511 – 2527 (1986)

[52] **Oehmichen M, Gerling I, Patzelt D:**
Alkohol als tödliche Droge. In: Oehmichen M, Patzelt D, Birkholz M (eds) Drogenabhängigkeit.
Schmidt-Römhild, Lübeck, 207 – 226 (1992)

[53] **Oehmichen M:**
Alkoholschäden. In: Pfeiffer J, Schröder JM und Paulus W (eds) Neuropathologie.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York , 419 – 429 (2002)

[54] **Pentney RJ:**
Quantitative analysis of ethanol effects on Purkinje cell dendritic tree.
Brain Res 249, 397 – 401 (1982)

[55] **Pentney RJ:**
Remodeling Of Neuronal Dendritic Networks With Aging And Alcohol.
Alcohol Alcohol Suppl 1, 393 – 397 (1991)

[56] **Pfefferbaum A, Lim KO, Zipursky RB, Mathalon DH, Rosenbloom MJ, Lane B, Ha CN, Sullivan EV:**
Brain gray and white matter volume loss accelerates with aging in chronic alcoholics: A quantitative MRI study.
Alcohol Clin Exp Res 16(6), 1078 – 1089 (1992)

[57] **Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Deshmukh A, Sullivan EV:**
Sex differences in the effects of alcohol on brain structure.
Am J Psychiatry 158, 188 – 198 (2001)

[58] **Pfefferbaum A:**
Alcoholism damages the brain, but does moderate alcohol use?
Lancet 3, 143 – 144 (2004)

[59] **Phillips SC:**
Qualitative and Quantitative Changes of Mouse Cerebellar Synapses after

Chronic Alcohol Consumption and Withdrawal.
Exp Neurol 88(3), 748 – 56 (1985)

[60] **Phillips SC, Harper CG, Kril J:**
A Quantitative Histological Study Of The Cerebellar Vermis In Alcoholic Patients.
Brain 110, 301 – 14 (1987)

[61] **Phillips SC:**
Cerebellar White Matter after Long-Term Ethanol Consumption in Mice.
J Stud Alcohol 51, 14 – 18 (1990)

[62] **Pratt OE, Rooprai HK, Shaw GK, Thomson AD:**
The genesis of Alcoholic brain tissue injury.
Alcohol Alcohol 25, 217 – 230 (1990)

[63] **Riethdorf L, Warzok R, Schwesinger G:**
Die Alkoholenzephalopathien im Obduktionsgut.
Zentralbl Pathol 137(1), 48 – 56 (1991)

[64] **Riley NE, Li J, McPhaul LW, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW:**
Heat shock proteins are present in Mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsy specimens
Exp Mol Path 74(2), 168 – 172 (2003)

[65] **Rintala J, Jaatinen P, Lu W, Sarviharja M, Eriksson P:**
Effects of lifelong ethanol consumption on cerebellar layer volumes in AA and ANA rats.
Alcohol Clin Exp Res 21(2), 331 – 317 (1997)

[66] **Rosenbloom M, Sullivan EV, Pfefferbaum A:**
Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics.
Alcohol research health 27(2), 146 – 152 (2003)

[67] **Sachs L:**
Angewandte Statistik.
Springer, 7. Auflage (1992)

[68] **Sarnat HB, Born DE:**
Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system.
Brain Dev 21(1), 41 – 50 (1999)

[69] **Seitz HK, Lieber CS, Simanowski UA:**
Handbuch Alkohol
Johann Ambrosius Barth (1995)

[70] **Shear PK, Sullivan EV, Lane B, Pfefferbaum A:**
Mammillary body and cerebellar shrinkage in chronic alcoholics with and without amnesia.
Alcohol Clin Exp Res 20(8), 1489 – 1495 (1996)

[71] **Silleis Smitt PAE, van der Loos C, Vianney de Jong JMB, Troost D:**
Tissue fixation methods alter the immunhistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum.
Acta Histochem 95(1), 13 – 21 (1993)

[72] **Sullivan EV, Harding AJ, Pentney R, Dlugos C, Martin PR, Parks MH, Desmond JE, Chen SHA, Pryor MR, Rosa ED, Pfefferbaum A:**
Disruption of frontocerebellar circuitry and function in alcoholism.
Alcohol Clin Exp Res 27(2), 301 – 309 (2003)

[73] **Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Gray EG:**
A morphometric golgi analysis of the Purkinje cell dendritic tree after long-term alcohol consumption in the adult rat.
J Neurocytology 12, 939 – 948 (1983)

[74] **Tavares MA, Paula-Barbosa MM:**
Remodeling of the cerebellar glomeruli afterlong-term alcohol consumption in the adult rat.
Brain Res 309, 217 – 226 (1984)

[75] **Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Volk B:**
Chronic alcohol consumption induces plastic changes in granule cell synaptic

boutons of the rat cerebellar cortex.
J Submicrosc Cytol 18(4), 725 – 730 (1986)

[76] **Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Verwer RWH:**
Synapses of the Cerebellar Cortex Molecular Layer After Chronic Alcohol Consumption.
Alcohol 4(2), 109 – 116 (1987)

[77] **Torvik AT:**
Brain lesions in alcoholics: Neuropathological observations.
Acta Med Scand Suppl 717, 47 –54 (1987)

[78] **Tuck RR, Brew BJ, Britton AM Loewy J:**
Alcohol and brain damage.
Br J Add 79, 251 – 259 (1984)

[79] **Vyberg M, Leth P:**
Ubiquitin: an immunohistochemical marker of Mallory bodies and alcoholic liver disease.
APMIS Suppl 23, 46 – 52 (1991)

[80] **von Wasielewski R, Werner M, Nolte M, Wilkens L, Georgii A:**
Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue sections on a broad panel of antibodies.
Histochemistry 102(3) 165 – 72 (1994)

[81] **Werner M, von Wasielewski R, Komminoth P:**
Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry.
Histochem Cell Biol 105(4), 253 – 260 (1996)

[82] **Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ, Ow KT, Malmström P, Busch C:**
Paraffin Section Storage and Immunohistochemistry.
Appl Immunohistochem Molecul Morphol. 8(1) 61 – 70 (2000)

[83] **Wiedenmann B, Franke WW:**
Identification and Localization of Synaptophysin, an Integral Membrane Glycoprotein of M_r 38,000 Characteristic of Presynaptic Vesicles.
Cell. 41, 1017 – 1028 (1985)

[84] **Witter H:**
Die Beurteilung Erwachsener im Strafrecht.
in: Göppinger H, Witter H (Hrsg.) Handbuch der forensischen Psychiatrie. Springer, Berlin Heidelberg New York (1972)

[85] **Zhang-Gouillon Z, Yuan Q, Hu B, Marceau N, French BA, Gaal K, Nagao Y, Wan YJY, French SW:**
Mallory Body Formation by Ethanol Feeding in Drug-Primed Mice.
Hepatology 27(1), 116 – 122 (1998)

Anhang

A. Tabellen

Tabelle A.1: *Wichtige Personal- und Anschlussdaten der 36 Alkoholiker (Gruppe 1). Die Gruppe besteht aus 8 Frauen und 28 Männern. Weitere Daten dieser Gruppe finden sich in Tab. A.2.*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Alkoholanamnese	BAK (‰)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)
1	72/90	33	m	191	83	vorhanden	1,93	Herzversagen	96	1260	o. B.
2	61/91	32	w	166	72	vorhanden	5,32	akute Alkoholintoxikation	ca. 120	1340	o. B.
3	108/91	37	m	165	43	vorhanden	0	Lungenentzündung	ca. 24	1210	innere und äußere Atrophie
4	192/91	46	m	170	86	vorhanden	0,91	inneres Verbluten	120	1400	o. B.
5	124/92	38	m	179	63	vorhanden	0,23	Rechtsherzversagen	41	1560	Stauung, Ödem
6	50/93	38	w	174	48	vorhanden	0	Pneumonie, Lungenödem	58	1380	o. B.
7	65/93	34	m	187	61	vorhanden	4,57	akute Alkoholintoxikation	ca. 30	1490	Stauung, Ödem
8	106/93	32	w	170	69	vorhanden	4,79	Speisebreiaspiration, akute Alkoholintoxikation	48	1400	o. B.
9	132/93	43	m	183	68	fehlt	5,06	akute Alkoholintoxikation	ca. 48	1370	Plexustumor, innere und äußere Atrophie, Stauung

Tabelle A.1: *Personal- und Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Alkoholanamnese	BAK (‰)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)
10	82/94	28	m	179	76	vorhanden	3,42	Ertrinkungstod	38	1280	o. B.
11	84/95	32	w	170	67	vorhanden	4,08	akute Alkoholintoxikation	ca. 24	1120	o. B.
12	88/95	43	m	184	93	vorhanden	4,31	akute Alkoholintoxikation	ca. 48	1640	Ödem, Atrophie
13	104/95	41	m	178	72	vorhanden	2,57	Strangulation	ca. 32	1300	o. B.
14	109/95	30	m	179	70	fehlt	2,34	inneres Verbluten nach Polytrauma	ca. 72	1350	o. B.
15	34/96	42	m	167	65	vorhanden	1,97	Hypothermie	48	1320	innere und äußere Atrophie
16	38/96	30	m	192	97	vorhanden	3,72	akute Alkoholintoxikation	ca. 24	1550	Ödem
17	47/96	42	m	177	57	vorhanden	0	inneres Verbluten	ca. 48	1540	o. B.
18	48/96	38	m	175	72	vorhanden	0	Hypothermie	ca. 48	1380	o. B.
19	71/96	31	m	189	80	fehlt	4,61	akute Alkoholintoxikation	32	1470	Ödem
20	100/96	33	m	180	68	fehlt	3,81	akute Alkoholintoxikation	ca. 72	1320	Ödem
21	112/96	48	m	187	105	vorhanden	3,02	Ertrinkungstod	ca. 48	1600	Ödem
22	18/97	46	m	191	82	vorhanden	4,30	akute Alkoholintoxikation	ca. 72	1690	Ödem
23	20/97	34	m	201	120	vorhanden	1,93	Ersticken	ca. 56	1550	o. B.
24	32/97	37	w	172	53	vorhanden	0	Herzinfarkt	ca. 48	1240	enges Ventrikelsystem

Tabelle A.1: *Personal- und Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Alkoholanamnese	BAK (‰)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)
25	35/97	37	m	187	70	vorhanden	2,86	äußeres Verbluten nach Sturz in Wohnung	ca. 24	1480	Atrophie, Ödem
26	47/97	36	w	171	60	vorhanden	2,22	Herzinfarkt	ca. 96	1260	erweitertes Ventrikelsystem
27	76/97	40	m	177	130	vorhanden	3,26	Ertrinkungstod	34	1400	Ödem
28	112/98	48	m	187	105	vorhanden	3,02	Ertrinkungstod	ca. 48	1600	Stauung, Ödem
29	151/98	43	w	164	44	vorhanden	0	inneres Verbluten	ca. 36	1290	äußere Atrophie
30	12/99	41	m	184	67	fehlt	4,42	akute Alkoholintoxikation	ca. 82	1390	o. B.
31	126/99	48	m	170	73	vorhanden	3,45	Ertrinkungstod	ca. 36	1260	o. B.
32	156/99	42	m	183	70	vorhanden	2,31	inneres Verbluten	ca. 120	1440	erweitertes Ventrikelsystem
33	186/99	34	m	185	87	vorhanden	3,24	inneres Verbluten	ca. 24	1360	o. B.
34	86/00	43	m	170	80	vorhanden	4,42	akute Alkoholintoxikation	ca. 116	1660	o. B.
35	88/00	44	m	180	77	vorhanden	3,24	Ersticken nach Schlammaspiration	ca. 62	1350	o. B.
36	129/00	47	w	166	63	vorhanden	0	inneres Verbluten	ca. 21	1290	o. B.
∅		39								1404	

Tabelle A.2: *Weitere Anschlussdaten der Gruppe 1 (Alkoholiker)*

Fallnummer	Lebergewicht (g)	Makro- u. Mikropathologie (Leber)	Nachweis von Ubiquitin	Makro- u. Mikropathologie (Pankreas)	Vorhandensein von Muskelatrophie	Anmerkungen
1	2340	Fettleber	negativ	o. B.	nein	Kardiomegalie
2	1670	o. B.	negativ	o. B.	nein	
3	1890	Fettleberzirrhose	negativ	Verkalkungen	ja	
4	2100	Fettleberzirrhose	negativ	o. B.	nein	Ösophagusvarizen
5	2340	Fettleberzirrhose	negativ	chronische Pankreatitis	ja	
6	2630	Fettleber	negativ	Fibrose und Verkalkungen	nein	Magenschleimhauterosionen
7	1940	Fettleberzirrhose	negativ	o. B.	ja	
8	2150	Fettleber	negativ	Fibrose	nein	
9	2000	Fettleber	negativ	o. B.	nein	
10	2450	Fettleber	negativ	o. B.	nein	
11	1920	Fettleberzirrhose	negativ	Lipomatosis	nein	
12	2150	Fettleberzirrhose	negativ	beginnende Lipomatose u. Fibrose	nein	Lipomatosis Cordis
13	2080	o. B.	negativ	o. B.	nein	
14	1850	o. B.	negativ	o. B.	nein	
15	1410	o. B.	negativ	o. B.	nein	
16	2300	o. B.	negativ	o. B.	nein	
17	1370	Fettleberzirrhose	negativ	fibrosierende Pankreatitis	ja	erosive Ösophagitis, TG : Nikotin, Koffein

Tabelle A.2: *Weitere Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Lebergewicht (g)	Makro- u. Mikropathologie (Leber)	Nachweis von Ubiquitin	Makro- u. Mikropathologie (Pankreas)	Vorhandensein von Muskelatrophie	Anmerkungen
18	1650	Stauung	negativ	o. B.	nein	
19	2190	o. B.	negativ	o. B.	nein	Candidose des Ösophagus
20	2000	Fettleberzirrhose	negativ	o. B.	nein	Gastritis
21	2600	Fettleber	negativ	Verfettung	nein	Arteriosklerose
22	2090	Fettleber	negativ	o. B.	nein	TG: CO-Hb 1 %
23	3070	Fettleber	negativ	Fibrose, hämorrhagische Pankreatitis	nein	Lipomatosis cordis, TG: CO-Hb 3 %
24	1020	o. B.	negativ	o. B.	nein	
25	1750	Fettleber	positiv	beginnende Lipomatose	nein	Cardiomyopathie
26	2600	Fettleber	positiv	Fibrose	nein	
27	2970	Zirrhose	negativ	o. B.	nein	Linksherzhypertrophie
28	2600	Fettleber	negativ	o. B.	nein	
29	1740	Zirrhose	positiv	o. B.	ja	Ösophagusvarizen
30	1390	Fettleber	negativ	o. B.	ja	
31	1820	Fettleber	positiv	o. B.	nein	TG: Nikotin
32	2110	Fettleberzirrhose	positiv	Fibrose	nein	Ösophagusvarizen
33	2390	Fettleberzirrhose	negativ	Verfettung, Fibrose	nein	Ösophagusvarizen, Gastritis

Tabelle A.2: *Weitere Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Lebergewicht (g)	Makro- u. Mikropathologie (Leber)	Nachweis von Ubiquitin	Makro- u. Mikropathologie (Pankreas)	Vorhandensein von Muskelatrophie	Anmerkungen
34	2620	Fettleber	negativ	o. B.	nein	chronischer Blutstau der Leber und Milz
35	2170	Fettleber, Fibrose	negativ	tumoröse Erkrankung	ja	mittelgeradige Herzmuskelhypertrophie
36	1660	Fettleber, Fibrose	negativ	Zirrhose, Pankreatitis	nein	Ösophagusvarizen
∅	2084	positiv:	5	ja:	7	
		negativ:	31	nein:	29	

Tabelle A.3: *Wichtige Personal- und Anschlussdaten der 40 Kontrollfälle (Gruppe 2). Die Gruppe besteht aus 18 Frauen und 22 Männern.*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)	Lebergewicht (g)	Anmerkungen
37	3/94	22	w	167	60	Lungeninfarkt	98	1300	o. B.	1720	
38	35/94	37	m	179	74	kombiniertes Herzversagen	ca. 24	1500	o. B.	1930	
39	69/94	21	w	163	56	Strangulation	ca. 48	1320	Ödem	1520	
40	138/94	29	w	170	76	Herzinfarkt	ca. 30	1270	o. B.	1870	subendokardiale Fibrose
41	151/94	29	m	186	83	Herzinfarkt	24	1560	o. B.	1990	BAK: 0,20 ‰

Tabelle A.3: *Wichtige Personal- und Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)	Lebergewicht (g)	Anmerkungen
42	196/94	35	w	165	53	Verbluten nach Messerstich ins Herz	ca. 6	1280	o. B.	1450	
43	29/95	29	m	188	82	Herzinfarkt	75	1650	o. B.	2070	
44	45/95	31	w	177	106	Lungenembolie	ca. 87	1390	o. B.	1880	
45	70/95	37	m	183	73	Ertrinken und Unterkühlung	72	1550	o. B.	1730	
46	117/95	37	m	180	103	Herzbeuteltamponade	72	1500	o. B.	2570	
47	150/95	34	w	165	40	Pneumonie	48	1350	o. B.	1730	
48	178/95	38	m	177	72	Verbluten bei Polytrauma	ca. 120	1620	o. B.	1470	
49	196/95	49	m	179	76	Rechtsherzversagen bei Lungenemphysem	96	1240	o. B.	1780	BAK: 0,39 ‰
50	31/96	37	w	170	65	akutes Herzversagen	ca. 24	1360	o. B.	1780	
51	96/96	28	w	184	86	Asystolie bei Herzrhythmusstörungen	ca. 24	1460	o. B.	2050	
52	94/96	46	m	185	87	globales Herzversagen bei Myokarditis	ca. 120	1450	Ödem	2230	
53	125/96	47	m	186	101	Verbluten	22	1550	o. B.	1980	
54	143/96	38	m	179	87	Stromtod	ca. 20	1370	Ödem	2000	Pankreasfibrose
55	29/97	42	m	178	103	Herzinfarkt	ca. 24	1510	o. B.	2570	Koronaratherosklerose
56	56/97	41	w	160	63	Verbluten bei Polytrauma	13	1240	o. B.	1170	

Tabelle A.3: *Wichtige Personal- und Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)	Lebergewicht (g)	Anmerkungen
57	100/97	45	m	173	82	inneres Verbluten	44	1370	o. B.	1900	
58	155/97	28	m	174	62	Ersticken bei akutem Pneumothorax	ca. 30	1500	o. B.	1560	rezidivirender Pneumothorax
59	157/97	45	m	163	60	Herzinfarkt	ca. 48	1390	Ödem	1470	Lungenödem
60	2/98	45	m	175	81	Herzinfarkt	ca. 72	1480	o. B.	2250	
61	84/98	45	w	160	64	Herzversagen bei hypertropher Kardiomyopathie	100	1280	o. B.	1650	
62	163/98	35	m	191	94	Ersticken bei Speisebreiaspiration	42	1630	o. B.	2450	diskrete diffuse Verfettung der Leber, Kardiomyopathie, alter Herzinfarkt
63	40/99	35	m	161	80	Herzinfarkt	92	1500	o. B.	1950	Pankreasfibrose
64	45/99	43	w	168	72	Mikroembolien der Lunge, Rechtsherzversagen	ca. 144	1460	o. B.	1790	
65	97/99	36	m	173	75	Ertrinkungstod	ca. 48	1660	o. B.	1725	
66	1/00	50	m	161	70	Herzinfarkt	105	1490	o. B.	1650	Kardiomegalie
67	36/00	46	w	180	80	Herzbeuteltamponade bei Aortenruptur	ca. 24	1400	o. B.	2150	
68	60/00	45	w	176	108	Rechtsherzversagen bei beginnender Pneumonie	ca. 96	1590	Ödem	2460	Adipositas, Lipomatosis codis et pankreatis, Kardiomegalie
69	95/00	23	w	167	65	Verbluten nach Polytrauma	48	1340	o. B.	1170	

Tabelle A.3: *Wichtige Personal- und Anschlussdaten (Fortsetzung)*

Fallnummer	Sektionsnummer	Alter (a)	Geschlecht (w/m)	Größe (cm)	Körpergewicht (kg)	Todesursache	postmortale Zeitspanne bis zur Fixierung (h)	Gewicht des unfixierten Gehirns (g)	Makro- u. Mikropathologie (Gehirn)	Lebergewicht (g)	Anmerkungen
70	102/00	36	w	161	82	Herzbeuteltamponade bei Aortenruptur	59	1180	o. B.	2600	Fettleber
71	107/00	24	m	172	89	akutes Lungenversagen im Schock	91	1460	Ödem	1480	
72	115/00	28	m	167	75	globales Herzversagen	ca. 31	1450	Ödem	1770	
73	122/00	26	w	170	84	Stromtod	ca. 24	1300	o. B.	1470	
74	157/00	41	w	164	59	infektiös–toxisches Regulationsversagen	ca. 13	1390	o. B.	1420	
75	176/00	44	w	166	65	Lungenembolie	96	1370	o. B.	1220	
76	187/00	37	m	174	90	Herzinfarkt	40	1490	o. B.	2100	
∅		37						1430		1843	

Tabelle A.4: *Semiquantitative Auswertung der Expression von Synaptophysin an den Purkinjezellen. Unterschieden wird eine starke Immunreaktion (Klasse 1), eine mäßige (Klasse 2) und eine schwache (Klasse 3).*

Alkoholiker	
Fallnummer	Klasse
1	3
2	1
3	3
4	3
5	3
6	3
7	1
8	3
9	1
10	2
11	3
12	2
13	1
14	1
15	3
16	2
17	1
18	3
19	1
20	1
21	2
22	1
23	3
24	1
25	1
26	1
27	3
28	3
29	2
30	3
31	3
32	1
33	1
34	1
35	1
36	3

Kontrollgruppe	
Fallnummer	Klasse
37	1
38	3
39	3
40	3
41	3
42	3
43	2
44	2
45	3
46	3
47	3
48	2
49	1
50	3
51	2
52	1
53	1
54	3
55	2
56	1
57	3
58	2
59	2
60	1
61	1
62	1
63	1
64	1
65	1
66	3
67	1
68	2
69	2
70	3
71	3
72	1
73	3
74	1
75	3
76	2

Tabelle A.5: *Perzentilen für die Fallmediane der Flächeninhalte der Glomeruli cerebellares, die in dem Box-Plot (Abb. 4.1) verwendet werden. Sei n der Stichprobenumfang und seien die einzelnen Werte aufsteigend geordnet, dann ist das r-te Perzentil durch den Wert an der Stelle $(n+1) \cdot r\,\%$ gegeben. Ist $(n+1) \cdot r\,\%$ keine ganze Zahl, so wird zwischen dem nächstkleineren und dem nächstgrößeren Wert interpoliert. Das 25. Perzentil der Kontrollgruppe berechnet sich z. B. folgendermaßen:*
Es gilt $n = 40$ und $(n+1) \cdot 25\,\% = 10{,}25$. Der zehntgrößte Median in der Gruppe hat den Wert $35{,}42\,\mu m^2$ (Fall 62) und der nächstgrößere Wert ist $37{,}40\,\mu m^2$ (Fall 58). Die Interpolation ergibt $35{,}42 + 0{,}25 \cdot (37{,}40 - 35{,}42) = 35{,}91$.

	Größenmediane der GC (μm^2)	
	Alkoholikergruppe	Kontrollgruppe
Minimum	25,33	17,67
5. Perzentile	28,94	23,69
25. Perzentile	35,33	35,91
50. Perzentile (Median)	45,61	44,34
75. Perzentile	54,20	50,96
95. Perzentile	72,10	67,79
Maximum	84,25	69,08

Tabelle A.6: *Messgrößen der Glomeruli cerebellares, die durch das IDMS gewonnen wurden. Für die ganze Gruppe sind die Mittelwerte bzw. der Median der Größenmediane angegeben.*

Alkoholiker				
Fall-nummer	Anzahl der GC in 20 Messfeldern	Anzahl der GC pro Messfeld	Median des Flächen-inhalts der GC (μm^2)	Flächendichte der GC (mm^{-2})
1	97	4,85	84,25	2531
2	105	5,25	69,96	2738
3	93	4,65	60,31	2428
4	97	4,85	54,63	2531
5	114	5,70	35,59	2970
6	94	4,70	51,20	2454
7	128	6,40	35,25	3332
8	96	4,80	44,54	2505
9	136	6,80	33,14	3538
10	123	6,15	34,33	3202
11	122	6,10	33,20	3177
12	107	5,35	33,57	2789
13	117	5,58	58,36	3048
14	94	4,70	37,48	2454
15	86	4,30	49,76	2247
16	102	5,10	54,39	2660
17	117	5,85	61,46	3048
18	105	5,25	44,67	2738
19	122	6,10	49,94	3177
20	112	5,60	58,33	2918
21	83	4,15	38,25	2169
22	99	4,95	50,52	2583
23	86	4,30	66,27	2247
24	108	5,40	53,63	2815
25	113	5,65	38,29	2944
26	136	6,80	34,51	3538
27	126	6,30	30,16	3280
28	82	4,10	29,58	2144
29	112	5,60	36,53	2918
30	111	5,55	46,55	2893
31	121	6,05	25,33	3151
32	89	4,45	41,61	2273
33	90	4,50	46,80	2350
34	110	5,50	46,70	2867
35	83	4,15	40,31	2169
36	77	3,85	49,88	2014
Gruppe	106,3	5,32	45,61	2745

Kontrollgruppe				
Fall-nummer	Anzahl der GC in 20 Messfeldern	Anzahl der GC pro Messfeld	Median des Flächen-inhalts der GC (μm^2)	Flächendichte der GC (mm^{-2})
37	158	7,90	33,89	4106
38	107	5,35	51,95	2789
39	119	5,95	48,64	3099
40	99	4,95	67,98	2557
41	116	5,80	45,20	3022
42	88	4,40	45,07	2299
43	115	5,75	39,90	2996
44	133	6,65	28,72	3461
45	124	6,20	43,41	3228
46	120	6,00	34,88	3125
47	128	6,40	44,84	3332
48	124	6,20	33,23	3228
49	86	4,30	45,11	2247
50	99	4,95	42,15	2583
51	111	5,55	49,60	2893
52	128	6,40	39,63	3332
53	117	5,85	64,22	3048
54	97	4,85	53,24	2531
55	113	5,65	44,41	2944
56	116	5,80	44,79	3022
57	107	5,35	44,26	2789
58	125	6,25	37,40	3254
59	98	4,90	41,92	2557
60	102	5,10	69,08	2660
61	94	4,70	60,37	2454
62	108	5,40	35,42	2815
63	113	5,65	46,12	2944
64	124	6,20	25,47	3228
65	103	5,15	56,05	2686
66	145	7,25	27,80	3771
67	102	5,10	40,64	2660
68	109	5,45	38,44	2841
69	117	5,85	50,81	3048
70	137	6,85	23,59	3564
71	63	3,15	40,75	1653
72	108	5,40	53,51	2815
73	52	2,60	17,67	1369
74	87	4,35	56,49	2273
75	110	5,50	51,01	2867
76	147	7,35	31,38	3822
Gruppe	112,2	5,61	44,34	2898

Tabelle A.7: *Häufigkeiten und Flächendichte der GC nach Größenklassen jeweils für die gesamte Gruppe. Ausgezählt wurden 20 Messfelder je Fall. Angegeben ist die Standardabweichung der Mittelwerte aller Fälle einer Gruppe nach Gleichung (3.1). Unter der Annahme einer Normalverteilung entspricht dies dem 68 %-Vertrauensbereich. Die letzte breitere Klasse beinhaltet in beiden Gruppen nur je 0,9 % der gezählten GC.*

	Alkoholikergruppe		Kontrollgruppe	
Flächeninhalt A der GC (μm^2)	Anzahl der GC	Flächendichte (mm^{-2})	Anzahl der GC	Flächendichte (mm^{-2})
$0 < A \leq 10$	190 ± 24,4	136,3 ± 17,5	253 ± 30,7	163,4 ± 19,8
$10 < A \leq 20$	487 ± 49,9	349,4 ± 35,8	649 ± 58,8	419,0 ± 38,0
$20 < A \leq 30$	535 ± 39,2	383,8 ± 28,1	630 ± 43,1	406,8 ± 27,8
$30 < A \leq 40$	528 ± 30,8	378,8 ± 22,1	576 ± 34,2	371,9 ± 22,1
$40 < A \leq 50$	447 ± 24,8	320,7 ± 17,8	533 ± 28,6	344,1 ± 18,4
$50 < A \leq 60$	356 ± 18,6	255,4 ± 13,4	421 ± 21,0	271,8 ± 13,6
$60 < A \leq 70$	238 ± 15,5	170,7 ± 11,1	313 ± 20,7	202,1 ± 13,3
$70 < A \leq 80$	203 ± 15,4	145,6 ± 11,0	244 ± 13,6	157,5 ± 8,8
$80 < A \leq 90$	154 ± 13,3	110,5 ± 9,6	176 ± 14,3	113,6 ± 9,2
$90 < A \leq 100$	141 ± 12,9	101,2 ± 9,2	134 ± 14,9	86,5 ± 9,6
$100 < A \leq 110$	108 ± 12,4	77,5 ± 8,9	114 ± 12,0	73,6 ± 7,8
$110 < A \leq 120$	69 ± 8,8	49,5 ± 6,3	93 ± 10,9	60,0 ± 7,1
$120 < A \leq 130$	87 ± 12,5	62,4 ± 9,0	79 ± 8,3	51,0 ± 5,4
$130 < A \leq 140$	47 ± 7,6	33,7 ± 5,4	48 ± 8,9	31,0 ± 5,7
$140 < A \leq 150$	35 ± 7,7	25,1 ± 5,5	44 ± 7,3	28,4 ± 4,7
$150 < A \leq 160$	38 ± 6,4	27,3 ± 4,6	25 ± 5,3	16,1 ± 3,4
$160 < A \leq 170$	30 ± 8,0	21,5 ± 5,8	25 ± 5,5	16,1 ± 3,5
$170 < A \leq 180$	23 ± 5,8	16,5 ± 4,1	23 ± 5,7	14,9 ± 3,7
$180 < A \leq 190$	22 ± 6,5	15,8 ± 4,6	17 ± 4,5	11,0 ± 2,9
$190 < A \leq 200$	17 ± 4,2	12,2 ± 3,0	14 ± 4,4	9,0 ± 2,9
$200 < A \leq 210$	7 ± 3,5	5,0 ± 2,5	12 ± 3,6	7,7 ± 2,3
$210 < A \leq 220$	15 ± 3,6	10,8 ± 2,6	12 ± 3,3	7,7 ± 2,1
$220 < A \leq 230$	5 ± 3,3	3,6 ± 2,3	9 ± 3,4	5,8 ± 2,2
$230 < A \leq 240$	10 ± 4,2	7,2 ± 3,0	3 ± 1,7	1,9 ± 1,1
$240 < A \leq 440$	35 ± 8,4	25,1 ± 6,0	41 ± 7,6	26,5 ± 4,9
Summe	3827	2745,5	4488	2897,7

Tabelle A.8: *Semiquantitative Auswertung der Expression von MBP in Windungstälern und -kuppen und in den Markzungen. Unterschieden wird eine starke Immunreaktion (Klasse 1), eine mäßige (Klasse 2) und eine schwache (Klasse 3).*

Alkoholiker			
Fallnummer	Windungstal	Windungskuppe	Markzunge
1	2	1	1
2	2	1	2
3	2	1	2
4	2	1	3
5	2	1	3
6	2	1	2
7	2	1	1
8	3	2	1
9	3	3	1
10	3	3	2
11	3	2	3
12	2	1	2
13	3	2	2
14	3	2	2
15	2	1	2
16	2	1	2
17	2	2	1
18	2	1	1
19	2	1	2
20	2	1	2
21	2	1	3
22	2	1	1
23	3	2	1
24	2	1	2
25	3	1	3
26	2	1	3
27	2	1	1
28	2	1	1
29	2	1	3
30	2	1	2
31	2	1	2
32	2	1	2
33	2	1	3
34	2	3	1
35	3	2	3
36	3	3	1

Kontrollgruppe			
Fallnummer	Windungstal	Windungskuppe	Markzunge
37	2	1	2
38	3	2	1
39	3	3	1
40	3	2	1
41	2	1	3
42	2	2	1
43	2	2	2
44	3	2	3
45	2	2	1
46	2	1	2
47	2	1	2
48	3	2	3
49	2	1	2
50	2	1	1
51	3	1	2
52	2	1	1
53	2	1	3
54	3	3	2
55	3	2	3
56	3	1	2
57	3	3	1
58	2	2	3
59	3	1	3
60	2	1	1
61	3	1	3
62	3	3	2
63	3	2	2
64	3	3	2
65	3	2	1
66	2	1	3
67	2	1	3
68	2	1	2
69	3	1	1
70	3	3	1
71	2	2	1
72	2	1	2
73	3	2	1
74	2	1	1
75	2	1	2
76	2	1	3

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. M. Oehmichen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz sowie die ideelle und fortdauernde Unterstützung während der gesamten Zeit der Anfertigung meiner Arbeit.

Dr. med. R. Eggers aus dem Institut für Anatomie für konstruktive Gespräche, Einarbeitung in das IDMS und Bereitstellung desselben. Auch die Bilder meiner Präparate habe ich mit seiner Hilfe und den Geräten aus dem Institut für Anatomie anfertigen können.

PD Dr. Friedrich aus dem Institut für Hochschuldidaktik für Beratung und Durchführung der statistischen Berechnungen.

Frau S. Rath, MTA aus dem Institut für Rechtsmedizin, für die kompetente Einarbeitung in die Grundlagen der Immunhistochemie und die Hilfestellungen während der präparativen Anfertigungen dieser Arbeit.

Meinem Mann *Eberhard Findeisen* für die konstruktive Kritik, die Hilfestellung beim Lay-Out und für die Bearbeitung der Bilder. Ohne seine Geduld wäre diese Arbeit nie fertiggestellt worden.

Meinen *Eltern*, die mir mit Kraft und Ermutigung jederzeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Gesa Lena Findeisen, geb. Giencke

geboren am 6. Oktober 1973 in Oldenburg (i. O.)

verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

1980 – 1984	Grundschule Röwekamp, Oldenburg
1984 – 1986	Orientierungsstufe, Oldenburg
1986 – 1993	Herbartgymnasium, Oldenburg
1990 – 1991	Teilnahme am Schüleraustauschprogramm in Australien für das 11. Schuljahr
Mai 1993	Abitur

Berufsausbildung

1993 – 1996	Schwesternschule der Universität Heidelberg
März/Apr. 1996	Praktikum am Nyanyadzi Rural Health Center in Zimbabwe
Sept. 1996	Staatliche Prüfung in der Krankenpflege

Hochschulausbildung

1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Aug. 1998	Physikum
Okt. 1999	Erstes Staatsexamen
März 2002	Zweites Staatsexamen

2002 – 2003	Praktisches Jahr: Innere Medizin — Asklepios Klinik Bad Oldesloe Chirurgie — Asklepios Klinik Bad Oldesloe und Westküstenklinikum Heide Gynäkologie — Asklepios Klinik Bad Oldesloe
Dez. 2003	Drittes Staatsexamen
Jan.–Juli 2004	Promotionssemester
Okt. 2004	Erteilung der Approbation

Famulaturen

März 1999	Innere Medizin — Western Isles Hospital in Stornoway (Schottland)
Sept. 1999	Allgemeinchirurgie — PIUS Hospital (Oldenburg)
Feb./März 2000	Chirurgie — Oshakati Hospital (Namibia)
Aug. 2001	Gynäkologie — Krankenhaus am Friedrichshain (Berlin)

Studienbegleitende Tätigkeiten

1996 – 2001	regelmäßige Nacht- und Wochenenddienste als Krankenschwester auf der neurochirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Lübeck
Nov. 99 – Jan. 00	biologisches Praktikum: Wildtierzählung in Namibia
2000	Notfallmedizinisches Praktikum beim Rettungsdienst Lübeck

Berufstätigkeit

Sep.04 – Feb.05	Anstellung als Assistenzärztin in einer diabetologischen Schwerpunktpraxis in Wandsbek, Hamburg
seit März 2005	Anstellung als Assistenzärztin in der chirurgischen Abteilung des Pius Hospitals in Oldenburg