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

Immunhistochemische Untersuchungen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) beim Tod durch Ersticken

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

vorgelegt von
Johanna Kühn
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2005

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Manfred Oehmichen
2. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. med. Erich Reusche
Tag der mündlichen Prüfung:	02.05.2006
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	02.05.2006

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

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Definition des Erstickens 2
1.2 Einteilung der Erstickungsformen 2
1.3 Forensisch relevante Erstickungsursachen 4
1.4 Nachweis des Todes durch Ersticken 7
1.4.1 Allgemeine Obduktionsbefunde 7
1.4.2 Spezielle Obduktionsbefunde bei forensisch relevanten Erstickungsformen 8
1.4.3 Klinisch-chemische und histologische Befunde 9
1.5 Neuropathologie des Erstickens 10
1.5.1 Selektive Vulnerabilität 10
1.5.2 Biochemische Mechanismen bei Sauerstoffmangel 10
1.5.3 Histologische Veränderungen bei Sauerstoffmangel 12
1.6 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) 13
1.6.1 Übersicht über Aufbau und Funktion der MAPs 13
1.6.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) 14

2 Fragestellung **16**

3 Material und Methoden **18**

3.1 Untersuchungsmaterial und dessen Aufbereitung 18
3.1.1 Untersuchungsmaterial und Auswahlkriterien 18
3.1.2 Neuropathologische Aufbereitung der Gehirne 19
3.1.3 Anfertigung der Schnittpräparate für die vorliegende Untersuchung 20
3.1.4 Prinzip der immunhistochemischen Färbung 20
3.1.5 Darstellung des MAP2-Antigens am Hirnschnitt 22
3.2 Histologie der untersuchten Regionen 24
3.2.1 Histologische Struktur der Ammonshornformation 24

3.2.2 Histologische Struktur des Neokortex 25
3.3 Quantifizierung und Auswertung 27
3.3.1 Quantifizierung der Antigenexpression 27
3.3.2 Statistische Auswertung 27

4 Ergebnisse **29**
4.1 Qualitative Auswertung der Schnittpräparate nach MAP2-Färbung 29
4.1.1 Pathologische Veränderungen 29
4.1.2 Färbeverhalten und fotografische Darstellung 29
4.2 Quantitative Auswertung der MAP2-Expression 35
4.2.1 Vergleich der Kollektive Akutversterben und Ersticken . . 36
4.2.2 Detaillierter Vergleich des Kontrollkollektivs mit den Kollektiven Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation 37
4.2.3 Vergleich der einzelnen Erstickungskollektive untereinander 38
4.2.4 Vergleich der Regionen innerhalb eines Kollektivs 39
4.2.5 Vergleich der MAP2-Expression in Abhängigkeit von der Überlebenszeit 40

5 Diskussion **41**
5.1 MAP2 als potentieller Hypoxiemarker 41
5.1.1 Literaturlage 41
5.1.2 Einordnung eigener Ergebnisse 42
5.2 Vergleich einzelner Erstickungskollektive 43
5.2.1 Vergleich der Erstickungskollektive mit dem Kontrollkollektiv 43
5.2.2 Vergleich der Erstickungskollektive untereinander 44
5.3 Vulnerabilität einzelner Regionen 46
5.3.1 Vulnerabilität der Ammonshornregion 46
5.3.2 Vulnerabilität der Großhirnrinde 47
5.4 Beziehung zwischen MAP2-Expression und Überlebenszeit 48
5.5 Qualitative Diskussion des Expressionsverlustes von MAP2 49
5.6 Kritik der Methodik 50
5.7 Ausblick für die weitere Forschung 51

6 Zusammenfassung **53**

Abkürzungsverzeichnis **54**

Literaturverzeichnis **55**

Abbildungsverzeichnis **63**

Tabellenverzeichnis **64**

A Aufschlüsselung der Kollektive **65**

B Nummerische und statistische Daten **68**

B.1 Nummerische Darstellung der MAP2-Expression 68

B.2 Darstellung der statistischen Signifikanz 72

C Chemikalien- und Gerätenachweis **75**

C.1 Chemikaliennachweis 75

C.2 Ansätze der Reagenziengemische 77

C.3 Gerätenachweis 78

D Danksagung **79**

E Lebenslauf **80**

Publikation **81**

Kapitel 1

Einleitung

Im Jahre 2003 wurden in Deutschland 5937 Todesfälle[1] durch „Ersticken“ registriert. Doch wie verlässlich ist diese Angabe wirklich?

Nach vorsichtigen Schätzungen wird jährlich in 11.000–22.000 Fällen eines nichtnatürlichen Todes eine natürliche Todesursache attestiert, darunter 1200–2400 unerkannte Tötungsdelikte [12]. Die Ursache liegt oftmals in einer — bewusst oder unbewusst — nachlässig durchgeführten Leichenschau (z.B. keine Entkleidung der Leiche, Verzicht auf Inspektion des Rückens oder der Körperöffnungen, Verlass auf Angaben Angehöriger), aber auch in einer generell sinkenden Sektionsrate in Deutschland. Doch selbst für einen sorgfältig untersuchenden Fachmann ist die Todesursache nicht immer erkennbar. Auch Fehldiagnosen sind nicht sicher auszuschließen, weder durch Obduktion, noch durch weiterführende biochemische oder histologische Untersuchungen. Diese Tatsache ist weniger der mangelnden Kompetenz der Rechtsmediziner anzulasten, als vielmehr dem Mangel an geeigneten Nachweismethoden für gewisse Tatabläufe und Todesursachen, ganz besonders für den Tod durch Ersticken.

Trotz intensiver Forschungen der letzen Jahren konnte bisher kein spezifisches und reproduzierbares Nachweisverfahren zur Diskriminierung des kurzfristig oder gar nicht überlebten Erstickungstodes gefunden werden, so dass man sich noch immer auf unspezifische Anzeichen bzw. auf den Ausschluss einer anderen Todesursache verlassen muss. Im Folgenden wird versucht festzustellen, ob durch Darstellung der Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) an Nervenzellen bereits zu frühen postasphyktischen Zeitpunkten die Diagnose des „Erstickens“ zu sichern ist.

[1] Quelle: Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes, ICD10-Position T71

1.1 Definition des Erstickens

Ersticken ist im weitesten Sinne mit jedem Sterbevorgang verbunden: der Herz-Kreislauf-Stillstand führt über den Ausfall der Blut- und Sauerstoffversorgung zu einer sekundären Erstickungssituation der Organe.

Unter forensischen Bedingungen wird dieser Erstickungsbegriff aber eingeschränkt: man spricht vom Erstickungstod, wenn die Erstickung der primär todesursächliche Faktor ist. Dabei umfasst der Begriff Erstickung alle pathophysiologischen Vorgänge, die durch Behinderung oder Blockade der Sauerstoffzufuhr, Sauerstoffaufnahme oder Sauerstoffverstoffwechselung in der Zelle sowie durch eine Behinderung der CO_2-Abatmung zu einem lebensbedrohlichen Zustand oder zum Tode führen [40, 56].

Im Zusammenhang mit dem Erstickungstod finden folgende Begriffe Verwendung: Von **Hypoxie** spricht man bei einem Mangel an, von **Anoxie** bei vollständigem Fehlen von Sauerstoff ohne Kohlendioxidanreicherung. Ein Sauerstoffmangel mit CO_2-Anreicherung (Hyperkapnie) wird dagegen als **Asphyxie** bezeichnet. Unter **Hypoxämie** versteht man die Herabsetzung des Sauerstoffgehalts im arteriellen Blut, unter **Hypoxidose** die O_2-Verminderung im Gewebe. Die unterbrochene arterielle Blutversorgung eines Organs bzw. eines Gefäßversorgungsgebietes wird **Ischämie** genannt.

1.2 Einteilung der Erstickungsformen

Die Erstickungsformen und ihre wichtigsten Ursachen können in drei Grundarten eingeteilt werden [6, 56]:

- hypoxische (bzw. ischämische) asphyktische Form
- hypoxische (bzw. ischämische) nicht-asphyktische Form
- anämische oder histotoxische Form

Dieser pathophysiologisch begründeten Einteilung steht die Unterscheidung in „äußeres“ und „inneres“ Ersticken gegenüber. Dabei bezeichnet „äußeres“ Ersticken die mechanische Behinderung der Atmung, „inneres“ Ersticken eine Störung

des Sauerstofftransportes im Blut oder der Sauerstoffverwertung im Gewebe. Mit Hilfe dieser Einteilung lassen sich allerdings nicht alle Arten von Ersticken eindeutig zuordnen [58], so dass im Folgenden die Darstellung der drei oben genannten Grundarten favorisiert wird:

Hypoxische (bzw. ischämische) asphyktische Erstickung

Diese Erstickungsform ist gekennzeichnet durch eine eingeschränkte Sauerstoffaufnahme und eine behinderte Kohlendioxidabgabe. Sie entspricht weitestgehend dem „äußeren“ Ersticken, also einer mechanischen Behinderung der Atmung durch verlegte Atemwege oder gestörte Atemmechanik. Der CO_2-Anstieg im Blut veranlasst das zentrale Nervensystem zur Zunahme der Atemfrequenz, der Pulsfrequenz, des Blutdrucks und der Katecholaminausschüttung. Subjektiv entwickelt sich das Gefühl der Atemnot und Todesangst.

Als Beispiele sind der Asthmaanfall oder der Spontanpneumothorax zu nennen, auf nicht natürlicher Ebene der Verschluss der Atemöffnungen, Verschüttung, Knebelung oder der Tod durch Ertrinken.

In Verbindung mit isolierter Ischämie des Gehirns gehören auch die Fälle von Strangulation, also Kompression der Halsweichteile, in diese Gruppe: Tod durch Erhängen, Erdrosseln und Erwürgen (ischämisch-asphyktische Erstickung).

Hypoxische (bzw. ischämische) nicht-asphyktische Erstickung

Die hypoxische nicht-asphyktische Erstickung ist bei gestörter Sauerstoffaufnahme durch die erhaltene Fähigkeit der Kohlendioxidabatmung gekennzeichnet. Der Sauerstoffmangel wird durch verminderten O_2-Partialdruck in der Atemluft ausgelöst. Dieser Fall entspricht einer Mischung aus äußerem und innerem Ersticken. Die subjektiven Missempfindungen wie Dyspnoe und Erstickungsangst fehlen, es kommt im Gegenteil sogar meist zur Euphorie, begleitet von Antriebsmangel und der Unfähigkeit zur Einsicht oder Ausführung von Abwehrmaßnahmen. Beispiele sind u.a. die Höhenkrankheit oder Narkosefehler mit Verwechslung von Sauerstoff und Lachgas. Auch eine reine Ischämie ohne Kohlendioxidanreicherung, z.B. bei isolierter Kompression der Karotiden, ist möglich (ischämisch nicht-asphyktische Erstickung).

Anämische oder histotoxische Erstickung

Liegt ein Verlust der Sauerstofftransportfunktion des Hämoglobins vor oder eine Blockade der Atmungskette des Zellstoffwechsels, handelt es sich um diese Art von Ersticken. Sie deckt sich größtenteils mit der Definition des inneren Erstickens, wobei auch hier wieder natürliche und nichtnatürliche Ursachen unterschieden werden können: zu den natürlichen Ursachen gehört u.a. die Anämie, während als nichtnatürliche Ursache vor allem die Kohlenmonoxidvergiftung von Bedeutung ist, seltener die Vergiftung durch Methämoglobinbildner oder Blausäure.

1.3 Forensisch relevante Erstickungsursachen

Unter den vielen möglichen Ursachen eines Erstickungstodes nehmen einige Erstickungsarten eine besonders exponierte Position ein. Hierzu zählen jene Formen, die in der forensischen Praxis gehäuft als Ursache eines nichtnatürlichen Todes auftreten und aus diesem Grund in der vorliegenden Studie untersucht wurden: der Tod durch Erhängen, Erdrosseln, Erwürgen und Ertrinken sowie der Tod durch Kohlenmonoxidvergiftung.

Die klinischen Erscheinungen sind bei allen Erstickungsarten annähernd gleich und können in verschiedene Phasen eingeteilt werden, die jeweils etwa 1–2 Minuten andauern. Ist die Luftzufuhr zu den Lungen gesperrt, kommt es infolge einer Reizung des Atemzentrums zur **Phase der Atemnot**, gekennzeichnet durch inspiratorische Dyspnoe und Bewusstseinsverlust. Ihr schließt sich das **konvulsive Stadium** mit Erstickungskrämpfen als Folge des zerebralen O_2-Mangels an. Der anschließenden **präterminalen Atempause** folgen noch einige schnappende, **terminale Atembewegungen**, gefolgt vom endgültigen Atemstillstand. Die Dauer des gesamten Erstickungsvorgangs beträgt 3–8 Minuten, wobei die Herzaktivität den Atemstillstand um bis zu 15 Minuten überdauern kann [6, 40, 51].

Der Tod durch Erhängen stellt in Deutschland die häufigste Suizidmethode dar. Selten wird er im Rahmen einer Tötung oder eines Unfalls festgestellt. **Erhängen** liegt dann vor, wenn ein um den Hals herumgeführtes, an einem Aufhängepunkt fixiertes Strangwerkzeug unter dem Eigengewicht des Körpers unter Zug gesetzt wird, so dass es zu einer Kompression der Halsweichteile kommt. Verläuft dabei der Strang symmetrisch mit dem höchsten Punkt im Nacken und hängt der

Körper frei, spricht man von typischem Erhängen, in allen anderen Fällen von atypischem Erhängen [11]. Im typischen Fall werden die Arterien und Venen des Halses gleichzeitig und vollständig komprimiert, so dass eine primäre Hirnanoxie ohne Asphyxie resultiert, der Blutgehalt des Kopfes ist normal. Die meist geringe Kompression der Atemwege trägt nicht wesentlich zum Tode bei. Bei den häufigeren atypischen Fällen eines Erhängungstodes sind Kombinationsabläufe mit asphyktischem Ersticken und Stauungssymptomen – aufgrund stärkerer Kompression der Venen als der Arterien – denkbar. Tödliche Verletzungen der Halswirbelsäule kommen praktisch nur bei Sturz aus größerer Höhe in die Schlinge vor. In sehr seltenen Fällen kommt es zu einem Abriss des Zahnfortsatzes mit einer Quetschung des oberen Halsmarks [40].

Neben dem Tod durch Erhängen zeichnen sich die anderen Strangulationsarten – Erdrosseln und Erwürgen – zwar durch geringere Häufigkeit aus, erlangen aber durch ihr Auftreten als Tötungsdelikt eine besondere Bedeutung. Vom **„Drosseln“** spricht man bei der Kompression des Halses durch Zusammenziehen eines um den Hals geschlungenen Strangwerkzeuges unter Muskelkraft; „Erdrosseln“ wird die Tötung durch diesen Mechanismus genannt. Hierbei handelt es sich meistens um Tötung durch fremde Hand; Suizide oder Unfälle sind selten. Beim **Erwürgen** handelt es sich dagegen immer um eine Tötung im Sinne einer Kompression der Halsweichteile mit den Händen. Ein suizidales Erwürgen ist demgegenüber auszuschließen [51].

Bei beiden zuletzt genannten Strangulationsarten wirken pathophysiologisch zwei Mechanismen: zum einen die beeinträchtigte Hirndurchblutung durch Gefäßkompression, zum anderen die mechanische Behinderung der Atmung durch Kompression der Trachea. Auch wenn beim Erwürgen angeblich die Atemwegsverlegung überwiegt, ist der tödliche Mechanismus doch im wesentlichen durch die Gefäßkompression bestimmt [40] (siehe Abb. 1.1).

Eine weitere Ursache des Erstickens stellt das Ertrinken dar, welches meist als Unfallereignis in Erscheinung tritt. Suizide oder Tötungsdelikte kommen seltener vor. **Ertrinken** ist eine Form des Erstickens aufgrund einer Flüssigkeitsaspiration, wobei die Luftzufuhr über die Atemwege durch ein flüssiges Medium verhindert wird [29]. Pathophysiologisch besteht eine Hypoxie. Stauungserscheinungen

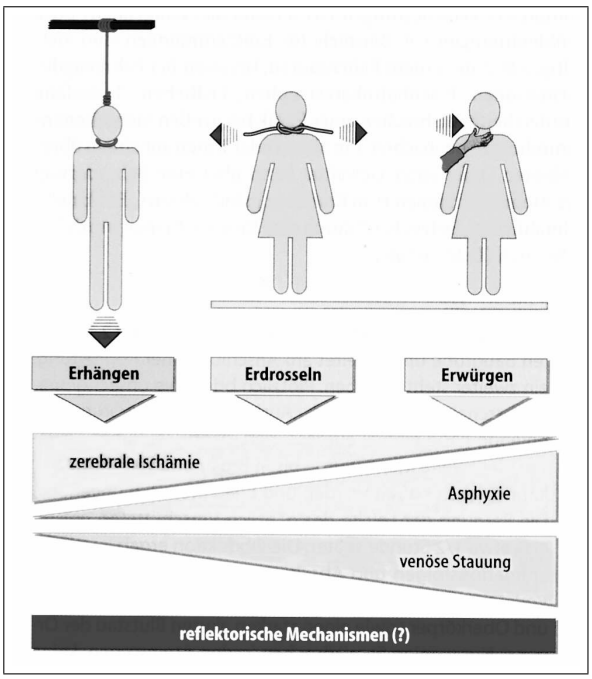

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der drei Hauptformen des Strangulationstodes sowie der beteiligten pathophysiologischen Mechanismen (modifiziert nach [40])

als Folge von Gefäßkompression wie bei den vorigen Erstickungsursachen sind nicht zu erwarten. Beim „typischen“ Ertrinken gelingt es in der Phase der Dyspnoe mehrmals aufzutauchen und nach Luft zu schnappen. Beim „atypischen“ Ertrinken entfällt dieser Vorgang, sei es durch Bewusstseinsverlust oder durch gewaltsames Untertauchen [51].

Ein Erstickungstod besteht auch bei der **Kohlenmonoxid-Intoxikation**. Sie ist die mit Abstand häufigste Ursache der histotoxischen Erstickung bei Unfall oder Suizid. Bei Kohlenmonoxid handelt es sich um ein farb- und geruchloses Gas, das bei unvollständiger Verbrennung gebildet wird. Suizide, Unfälle und auch Tötungen wurden häufig durch Einleitung von Auspuffabgasen in Pkws oder in Garagen beobachtet. Heute stellen Rauchgase bei Wohnungsbränden oder Propangase in Campingwagen eine häufige Vergiftungsquelle dar.

Der normale CO-Gehalt der Atmosphäre beträgt $0,1\,\text{ppm}$ (parts per million). Bereits bei einer CO-Konzentration der Atemluft von $0,4\,\%$ tritt in etwa 30 Minuten der Tod ein [6]. Die Wirkung des Kohlenmonoxids beruht auf seiner

im Vergleich zu Sauerstoff etwa 300x stärkeren Affinität zum zweiwertigen Eisen im Hämoglobin. Der Sauerstoff wird aus seiner Bindung verdrängt, so dass das gebildete Carboxyhämoglobin (CO-Hb) zu einem verminderten Sauerstofftransport durch das Blut führt. Darüber hinaus kann das teilbelegte Oxyhämoglobin weniger leicht O_2 abgeben, da der verbleibende Sauerstoff noch fester gebunden wird (Haldane-Effekt). Eine zusätzliche toxische Wirkung, z.B. auf zelluläre Cytochrome, wird diskutiert [48, 77].

Der Tod durch Kohlenmonoxidvergiftung tritt am gesunden Körper bei einem CO-Hb-Anteil von etwa $60 - 70\,\%$ des Gesamthämoglobins ein. Durch die rasche Verdrängung des Sauerstoffs vom Hämoglobin kommt es schnell zu einem Bewusstseinsverlust, weshalb auch beim Erkennen der Gefahr oft keine Selbstrettung mehr möglich ist [38].

1.4 Nachweis des Todes durch Ersticken

1.4.1 Allgemeine Obduktionsbefunde

Trotz der unterschiedlichen Mechanismen der einzelnen Erstickungsformen, lassen sich einige gemeinsame und häufig auftretende Leichenbefunde zusammenfassen, die mehr oder weniger deutlich und in unterschiedlichem Ausmaß nachweisbar sind. Hierzu zählen Zyanose und Dunsung des Gesichtes, punktförmige Blutungen an Haut und Schleimhäuten, geblähte Lungen und blutreiche Organe bei entspeicherter Milz [6, 40].

Diese allgemeinen Erstickungsbefunde treten zwar mit großer Regelmäßigkeit auf, der Nachweis der Todesursache gestaltet sich allerdings häufig als schwierig: weder äußere noch innere Obduktionsbefunde sind pathognomonisch. So werden Stauungszeichen auch bei Rechtsherzversagen anderer Ursache oder Punktblutungen bei intrathorakaler Drucksteigerung infolge von Hustenanfällen oder Presswehen angetroffen. Bei Nachweis einer konkurrierenden Todesursache (z.B. Koronararterienstenose) kann es außerordentlich schwierig sein, die letale Ursache festzulegen. Viele der genannten Befunde lassen sich zudem auch postmortal auslösen [40, 51].

Auch wenn es an eindeutigen Beweisen mangelt, gibt es dennoch einige für einzelne Erstickungsursachen charakteristische Leichenbefunde, die im folgenden dar-

gestellt werden. Im Einzelfall gilt die Summe der Befunde und der meist negative übrige Organbefund als Kriterium für einen Tod durch Ersticken.

1.4.2 Spezielle Obduktionsbefunde bei forensisch relevanten Erstickungsformen

Typischer äußerer Befund beim **Erhängen** ist die – meist nach hinten – ansteigende Strangmarke. Im Gegensatz zum Erwürgen und Erdrosseln entstehen beim typischen Erhängen keine Blutstauungen oder Petechien im Gesicht, beim atypischen Erhängen meist nur in schwacher Form. Ursprungsblutungen der Kopfwendermuskeln und Einblutungen unter das vordere Längsband der Wirbelsäule (Simon´sche Blutungen) werden als relativ charakteristische innere Befunde des Erhängens beobachtet [40, 51].

Beim Tod durch **Erdrosseln** oder **Erwürgen** resultieren äußerlich eine meist horizontal verlaufende Drosselmarke oder Würgemale (Hämatome durch Fingerkuppendruck bzw. halbmondförmige Druckmarken durch Fingernageldruck). Auch Fingernagelkratzspuren und ausgeprägte Stauungsbefunde des Kopfes geben Hinweise auf diese Todesursachen. Innerlich findet man häufig starke Einblutungen in die Halsmuskelschichten sowie Kehlkopf- und Zungenbeinbrüche [40, 51].

Der Tod durch **Ertrinken** ist von außen durch das (fakultative) Auftreten eines Schaumpilzes vor Mund und Nase charakterisiert. Stauungszeichen wie Gesichtsdunsung, Zyanose oder Petechien sind gering bis gar nicht ausgeprägt. Typische späte Veränderungen an Leichen im Wasser sind Treib-, Schiffsschrauben- oder Tierfraßverletzungen, die aber nicht das Ertrinken als Todesursache beweisen. Unter den inneren Befunden fallen die zum Teil massiv geblähten Lungen auf (Emphysema aquosum). Allerdings kann diese Veränderung bei atypischem Ertrinken auch fehlen. Ein weiteres Indiz sind Wasser im Magen und so genannte Paltauf´sche Flecken, durch Ertrinkungsflüssigkeit hämolysierte Petechien an der Pleura pulmonalis. Eine häufige Beobachtung bei „Wasserleichen“ sind Fäulnisveränderungen, die die typischen Befunde überlagern können [29, 51].

Einzig für die **Kohlenmonoxidvergiftung** besteht ein spezifischer Nachweis: wenn im Herzblut der Leichen gaschromatographisch oder photometrisch ein

CO-Hb-Gehalt von über 60 % gemessen wird, gilt die CO-Intoxikation als Ursache des Todes. Als typischer Leichenbefund stellt sich die hellrote bis kirschrote Farbe der Totenflecken und der Organe dar, die allerdings auch bei Kälteeinwirkung und Blausäurevergiftung nachgewiesen werden kann [38].

1.4.3 Klinisch-chemische und histologische Befunde

Auch beim Fehlen der oben genannten Leichenveränderungen kann ein Erstickungsvorgang nicht endgültig ausgeschlossen werden. Zur weiteren Hilfe bedient man sich klinisch-chemischer und histologischer Untersuchungen, die die Diagnose eines Erstickungstodes zwar nicht beweisen, aber stützen können. Zu den Blutbefunden gehören ein Anstieg der Katecholamine, der allerdings sehr autolyseanfällig ist [5], eine Hyperglykämie, eine Fibrinolysesteigerung sowie eine Erhöhung des Phospholipidspiegels im Serum [51]. In der forensischen Routine haben sich diese Nachweismethoden allerdings nicht allgemein durchgesetzt.

Ebenso unsicher sind alle histologischen Merkmale, die – abgesehen von lädierten elastischen Fasern in Alveolarsepten Ertrunkener – ein protrahiertes Ersticken bzw. eine gewisse Überlebenszeit voraussetzen. Dann stellen sich folgende mögliche Befunde dar: eine vakuolige Degeneration der Hepatozyten und der Myokardzellen, herdförmige Ganglienzellnekrosen im Gehirn und die relativ typische aber seltene symmetrische Linsenkernerweichung bei CO-Intoxikation [40]. Diese Veränderungen treten jedoch erst nach Überlebenszeiten von mehreren Stunden auf [43].

Ein histologischer Marker, der den Erstickungstod möglichst auch ohne Voraussetzung einer längeren Überlebenszeit nachweist, würde für die Aufklärung dieser Todesursachen einen enormen Fortschritt bedeuten. Um die erforderlichen Eigenschaften eines solchen Markers zu verstehen, sollte man sich die Veränderungen auf zellulärer Ebene bei Sauerstoffmangel verdeutlichen, wie in den folgenden Abschnitten dargestellt.

1.5 Neuropathologie des Erstickens

1.5.1 Selektive Vulnerabilität

Sauerstoffmangel ist eine der wichtigsten und häufigsten Ursachen einer Zellschädigung. Dabei stellt sich das Gehirn als Organ dar, welches am sensibelsten auf eine unterbrochene Sauerstoffzufuhr reagiert: spätestens nach drei- bis achtminütiger Ischämiezeit ist von einer irreversiblen Schädigung auszugehen, nach zehn Minuten vom Hirntod [43].

Auch innerhalb des Gehirns gibt es eine Abstufung der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel, die so genannte selektive Vulnerabilität. Danach sind Ammonshorn, Großhirnrinde, Kleinhirn und Basalganglien besonders empfindlich, wobei die Ursache trotz intensiver Studien bis heute diskutiert wird. Regionale Unterschiede in der Blutversorgung durch Kollateralen und/oder unterschiedliche intrinsische Anfälligkeit gegenüber Ischämie werden diskutiert [7], ebenso wie die heute weitgehend anerkannte Glutamat-Theorie, wonach die Neurone der empfindlichen Regionen eine besonders hohe Konzentration an Glutamat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) aufweisen, die die exzitotoxische Kaskade stimulieren [3, 63, 74] (siehe Kapitel 1.5.2).

Eine weitere Abstufung geschieht zwischen Parenchym- und Stromazellen. Im Gehirn reagieren die Nervenzellen sensibler auf Sauerstoffmangel als Gliazellen, vermutlich da nur Nervenzellen exzitatorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen [3], deren Stimulation dann gemäß der Glutamat-Hypothese einen selektiven Untergang der Neurone bewirkt (elektive Parenchymnekrose). Innerhalb der Neurone zeigt sich der ischämische Schaden zuerst in den peripheren Dendriten und breitet sich dann nach proximal zum Nervenzellkörper aus [65].

1.5.2 Biochemische Mechanismen bei Sauerstoffmangel

Auf subzellulärer Ebene sind bei einem Sauerstoffmangel zuerst die Mitochondrien betroffen. Als „Kraftwerk“ der Zelle zieht ihr Funktionszusammenbruch alle weiteren Zellveränderungen nach sich (siehe Abb. 1.2).

Zunächst bewirkt der Sauerstoffmangel einen Abfall der oxydativen Phosphorylierung und damit des zellulären ATP-Gehaltes. Als Versuch eines Ausgleichs wird die anaerobe Glykolyse stimuliert, die eine erhöhte Laktatproduktion und

einen pH-Abfall zur Folge hat. Durch den bestehenden ATP-Mangel kann die Funktion der Ionenpumpen nicht aufrechterhalten werden. Natrium-, Calcium- und Wassereinstrom in die Zellkompartimente führen zum Zellödem und zur Verstärkung der Azidose. Die vakuolige Degeneration des endoplasmatischen Retikulums geht mit einer gestörten Proteinsynthese einher, die calciumabhängige Schädigung des Zytoskeletts mit bläschenförmigen Zytoplasmaausstülpungen (apikales Zellödem).

Der irreversible Schaden wird durch einen Einriss der intrazellulären Membranen und der Plasmamembran eingeleitet. Dadurch kommt es zu einem endgültigen Zusammenbruch der Ionenverteilung, insbesondere der Calcium-Homöostase. Zellkomponenten treten aus der Zelle aus und aktivierte lysosomale Enzyme sind für die vollständige Auflösung der Membranreste verantwortlich [14, 15, 16, 52].

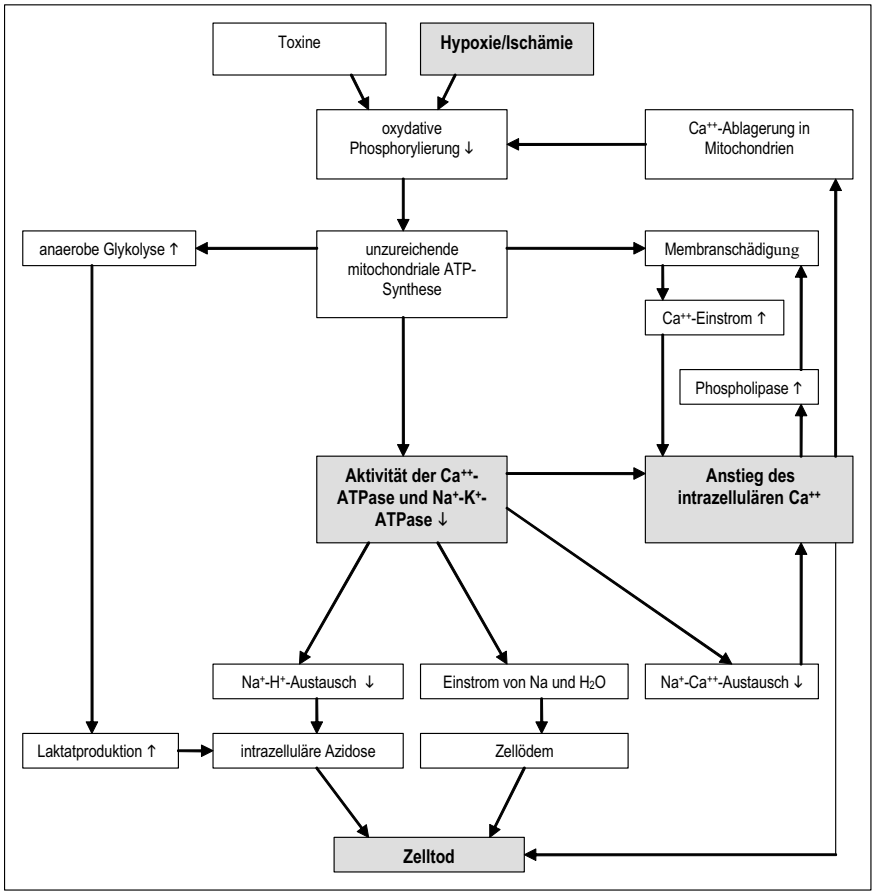

Abbildung 1.2: Darstellung der Signalkette bei zellulärer Schädigung durch Hypoxie/Ischämie (modifiziert nach [15])

Die Beobachtung der toxischen Wirkung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat auf die Nervenzelle durch Olney [46] führte zu dem heute favorisierten Konzept der **Exzitotoxizität**. Unter Exzitotoxizität versteht man ein Absterben von Neuronen aufgrund zu massiver oder zu langer Einwirkung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat. Demnach käme es bei Ischämie durch Depolarisation zu einer vermehrten Glutamat-Freisetzung, welches über Stimulation von NMDA-Rezeptoren zu einer Depolarisation weiterer Zellen und zur intrazellulären Calciumfreisetzung führen soll [36, 53]. Trotz steigender Anerkennung dieses Konzeptes gibt es auch Gegenstimmen, die Fragen aufwerfen und eine weitere Bestätigung der Hypothese verlangen [41].

1.5.3 Histologische Veränderungen bei Sauerstoffmangel

Der strukturelle, lichtmikroskopische Nachweis ischämischer Zellveränderungen ist in seiner Ausprägung abhängig vom Ausmaß der Reperfusion:

Liegt eine **globale Ischämie ohne Reperfusion** vor, gestalten sich zytologische Veränderungen als äußerst diskret. Es findet sich eine blasse Nervenzellschädigung („pale nerve cell injury“ [28]) mit wässrigem Zytoplasma, leichter mitochondrialer Schwellung, dilatiertem endoplasmatischem Retikulum und verplumptem Kernchromatin. Lichtmikroskopisch können diese Veränderungen erst nach mehreren Stunden durch Abblassung hervortreten [43]. Reaktive Veränderungen fehlen aufgrund mangelnder Durchblutung.

Bei einer **globalen Ischämie mit Reperfusion** wird eine so genannte dunkle Nervenzellschädigung („dark nerve cell injury“ [28]) mit lichtmikroskopisch sichtbarer Eosinophilie beobachtet: verdichtetes Zyto- und Karyoplasma, exzessiv geblähte Mitochondrien und geschwollene perineurale und perivaskuläre Astrozytenfüße können nachgewiesen werden [43]. Die starke Ausprägung dieser Veränderungen wird durch die Reperfusion erklärt, die Energieträger bereitstellt und so nachfolgende reaktive Veränderungen wie Volumenverschiebungen ermöglicht. Da diese sichtbaren Schäden oft erst mit einer gewissen Latenz auftreten, wird auch von „Reifung“ oder „maturation“ gesprochen [28].

Die genannten Zellveränderungen sind relativ unspezifisch und bei fehlender Reperfusion nur äußerst diskret. Dies reicht für einen neuropathologisch sicheren

Nachweis eines Erstickungstodes in der Regel nicht aus, zumal nur selten ein Zeitraum im Stundenbereich überlebt wird, der zu der oben angesprochenen „Reifung“ der Zellveränderungen führen könnte.

Ein geeigneter histologischer Marker zum Nachweis eines Sauerstoffmangels im Gehirn sollte folgende Bedingungen erfüllen: er müsste prompt und spezifisch auf eine Hypoxie oder Ischämie (auch ohne Reperfusion) reagieren, z.B. indem er in die oben genannte Kaskade biochemischer Zellreaktionen mit einbezogen ist. Außerdem sollte ein einfacher Nachweis möglich sein, z.B. mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktion. In dieser Studie soll geprüft werden, ob das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) diesen Anforderungen gerecht wird.

1.6 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

1.6.1 Übersicht über Aufbau und Funktion der MAPs

Mikrotubuli-assoziierte Proteine nehmen als grundlegende Proteine des neuronalen Zytoskeletts eine bedeutende Rolle bezüglich Motilität und Transport innerhalb der Zelle ein [8, 23, 47].

Es handelt sich um faserige Moleküle unterschiedlicher Länge ($50 - 185\,\mathrm{nm}$), die aufgrund ihrer Bindungsfähigkeit zu Mikrotubuli diese stabilisieren oder destabilisieren können [20]. Mikrotubuli, hohle zylindrische Polymere aus α- und β-Tubulin, dienen dem zytoplasmatischen Transport von Organellen sowie dem Auf- und Abbau der Mitosespindeln [26]. Als dynamische Moleküle sind sie dem ständigen Wechsel von Verlängerungs- und Verkürzungsphasen unterworfen. Durch Ausbildung von Brückengliedern gelingt es den MAPs den Verkürzungsphasen durch Stabilisierung entgegen zu wirken. Sind diese Phasen hingegen erwünscht, greift die MAP2-Kinase in den Prozess ein: sie phosphoryliert die MAPs und senkt dadurch deren Affinität und damit Bindungsfähigkeit zu den Mikrotubuli. Somit ist ein Regulierungsweg vorhanden, der auf extrazelluläre Signale mit Umbau des Mikrotubuli-Netzwerks reagieren kann [20].

In den letzten Jahren wurden immer mehr MAP-Subtypen beschrieben, wobei zum Teil erst später die Überschneidung mit bereits entdeckten Typen ersichtlich wurde. Trotz resultierender Verwirrungen in der Nomenklatur lassen sich

folgende Hauptgruppen zusammenfassen: MAP1A, 1B (= MAP5), MAP2A, 2B, 2C, (MAP3), MAP4 und das Protein Tau. Dabei ist MAP3 mit MAP4 zumindest verwandt, wenn nicht identisch.

Außer MAP4, welches sich in teilenden Zellen befindet, ist das Vorkommen aller anderen MAPs auf Nervenzellen beschränkt. MAP2A und 2B sind ausschließlich in Dendriten und im Nervenzellkörper zu finden, Tau nur in Axonen, wohingegen MAP1A, 1B und 2C in allen Nervenzellkompartimenten anzutreffen sind. Auch in der Funktion lassen sich Unterschiede feststellen. So dient MAP1B vorwiegend dem Neuritenwachstum, während MAP2C in der Plastizität und Synapsenbildung und Tau in der Stabilisierung der Mikrotubuli seine Hauptaufgabe findet [20, 26, 69].

1.6.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)

MAP2 ist das häufigste Mikrotubuli-assoziierte Protein im Gehirn. Es wird ausschließlich von Nervenzellen im Hirngewebe exprimiert, liegt nur selten an Mikrotubuli gebunden vor und zeigt eine starke Tendenz zur Selbstassoziation. Die drei Unterarten des Proteins (MAP2A, 2B, 2C) gehen durch alternatives Splicing aus einem Gen hervor. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse lassen sie sich in der SDS-Elektrophorese auftrennen. Die Formen 2A und 2B zeichnen sich durch ein hohes Molekulargewicht (∼280 kDa, „high molecular“), die Form 2C (∼70 kDa, „low molecular“) durch ein niedriges Gewicht aus.

Während MAP2A und 2B im Gehirn des Erwachsenen als thermostabiles Paar in Nervenzellkörpern und Dendriten vorliegen, findet man MAP2C vorwiegend im embryonalen Gehirn und dort zusätzlich in Axonen und Gliazellen. Der Wechsel von „frühen“ (2C) zu „späten“ (2A, 2B) MAPs vollzieht sich in der zweiten postnatalen Woche, da hier das Neuritenwachstum nachlässt und Stabilisierungsprozesse beginnen [8, 20, 69].

Durch die Phosphorylierung wird zum einen die Bindungsfähigkeit zu den Organellen reguliert, zum anderen auch der Abbau der MAPs. So hat ein stark phosphoryliertes MAP2 zwar nur eine geringe Affinität zu Mikrotubuli, dafür aber eine hohe Resistenz gegenüber einer Hydrolyse durch die calciumaktivierte Protease Calpain [26]. Dieser calciumaktivierte Abbau von MAP2 wird vermutlich verstärkt bei Sauerstoffmangel ausgelöst und ist der Grund, weshalb man sich dieses Protein als spezifischen Marker für O_2-Mangel in Nervenzellen erhofft.

Eine führende Hypothese besagt, dass durch den hypoxisch bzw. ischämisch ausgelösten intrazellulären Calciumanstieg die calciumabhängigen Proteasen Calpain und Caspase aktiviert werden und zur proteolytischen Degeneration von MAP2 führen [32, 39, 47, 65]. Eine mögliche Bestätigung für diesen Mechanismus kann darin gesehen werden, dass Calpain-Inhibitoren den MAP2-Abbau schützen [50].

Ob diese Sauerstoffempfindlichkeit ausreicht, um MAP2 als prompten und verlässlichen Hypoxiemarker auszuweisen, ist Gegenstand zum Teil kontroverser Debatten und wird in der Diskussion (Kapitel 5) unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse detailliert erörtert.

Kapitel 2

Fragestellung

Erstickungsvorgänge stellen in der forensischen Praxis eine häufig anzutreffende Todesursache dar – sowohl im Unfallgeschehen, als auch bei Tötungsdelikten oder bei Suizidhandlungen. Besonders das Ertrinken oder die Kohlenmonoxidvergiftung treten als Folge von Unfallereignissen auf, während Erdrosseln oder Erwürgen als Tötungsdelikte von Bedeutung sind; das Erhängen andererseits ist eine häufig gewählte Methode der Selbsttötung.

Trotz der Wichtigkeit dieser Geschehensabläufe sind die vorhandenen Nachweismethoden eines Erstickungstodes – wie bereits in Kapitel 1.4.1 erläutert – größtenteils unspezifisch und daher kritisch zu bewerten. Es fehlt ein spezifischer, reproduzierbar einsetzbarer morphologischer Marker, der die frühen neuropathologischen Veränderungen eines Erstickungstodes nachweisen kann.

In den letzten Jahren wurde verstärkt an solch einer Nachweismethode geforscht. Besondere Beachtung fanden dabei die Neuron-spezifische Enolase (NSE), Hitzeschockproteine HSP 70 und 72 und der Zytoskelettbaustein α-Tubulin [1, 44, 65, 73]. Als ein besonders früh auf Sauerstoffmangel reagierender Marker stach das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) hervor, das bereits nach einer Ischämiezeit von 5 min morphologische Zellveränderungen anzeigen soll [32, 65, 76]. Diese Erkenntnisse wurden allerdings in optimierten und standardisierten Tierversuchen gewonnen, eine systematische Anwendung an forensischen Gewebeproben des humanen Gehirns steht noch aus.

In den Untersuchungen dieser Studie wurde der potentiell sensitive Hypoxiemarker MAP2 daher an forensischen Gewebeproben von Ammonshorn und Großhirnrinde – zwei besonders vulnerablen Bereichen des Gehirns – getestet. Gemäß den Erkenntnissen aus der Literatur sollte sich in Fällen eines Erstickungstodes eine Reduktion der Anzahl MAP2-exprimierender Nervenzellen darstellen. Dabei wurde die Beantwortung folgender Fragestellungen zum Ziel gesetzt:

Fragestellung 1 und 2

Ist MAP2 ein früher, sensitiver und spezifischer Hypoxiemarker?
Untersucht anhand der Frage: Ergeben sich Unterschiede in der Expression von MAP2 beim Tod durch Ersticken (Erstickungskollektiv) gegenüber einem Tod durch Akutversterben (Kontrollkollektiv)?
Wenn ja, wie unterscheidet sich die MAP2-Expression aufgeschlüsselter Erstickungskollektive (Erhängen/Ertrinken/CO-Intoxikation) von dem Kontrollkollektiv?

Fragestellung 3

Lassen sich einzelne Erstickungsursachen durch MAP2-Färbung diskriminieren?
Untersucht anhand der Frage: Ergeben sich Unterschiede in der Expression von MAP2 beim Vergleich der Kollektive eines Todes durch Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation untereinander?

Fragestellung 4

Sind einzelne Segmente des Ammonshorns oder einzelne Nervenzellschichten der Großhirnrinde besonders vulnerabel?
Untersucht anhand der Frage: Ergeben sich Unterschiede in der Expression von MAP2 zwischen den einzelnen Ammonshornsegmenten bzw. den Hirnrindenschichten innerhalb eines Kollektivs?

Fragestellung 5

Lässt sich eine Aussage über die Überlebenszeit aufgrund der MAP2-Expression machen?
Untersucht anhand der Frage: Ergeben sich Unterschiede in der Expression von MAP2 in Abhängigkeit von der Überlebenszeit bei einem Tod durch Ersticken?

Die Klärung dieser Fragen soll die Suche nach einem geeigneten neuropathologischen Hypoxiemarker voranbringen. Außerdem gelingt es möglicherweise, durch ein besseres Grundlagenverständnis die therapeutischen Interventionsmöglichkeiten bei Hypoxie oder Ischämie zu optimieren.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial und dessen Aufbereitung

3.1.1 Untersuchungsmaterial und Auswahlkriterien

Das untersuchte Fallmaterial entstammt dem Obduktionsgut des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, aus den Jahren 1992–2002. Die Diagnosen stützen sich auf die morphologischen Befunde sowie die Krankheitsvorgeschichte und die polizeilichen Ermittlungsberichte, in Fällen einer CO-Intoxikation auch auf biochemische Analysen. Folgende Kollektive wurden, basierend auf der gesicherten Todesursache, gebildet:

Kollektiv 1: *Akutversterben*
(n = 27; m = 19, w = 8; mittleres Lebensalter: 37 Jahre)

Kollektiv 2: *Tod durch Erhängen*
(n = 19; m = 17, w = 2; mittleres Lebensalter: 39 Jahre)

Kollektiv 3: *Tod durch Ertrinken*
(n = 14; m = 11, w = 3; mittleres Lebensalter: 46 Jahre)

Kollektiv 4: *Tod durch Kohlenmonoxid (CO) -Intoxikation*
(n = 12; m = 10, w = 2; mittleres Lebensalter: 38 Jahre)

Kollektiv 5: *Tod nach kurzzeitig überlebter Hypoxie/Ischämie*
(n = 9; m = 7, w = 2; mittleres Lebensalter: 38 Jahre)

Voraussetzung für die Aufnahme in das Kollektiv 1 (Akutversterben) war eine Todesursache, die eine extrem kurze Agonie, d.h. ohne Hypoxie oder Ischämie, annehmen ließ. Sie wird bei allen Fällen dieser Gruppe durch die Todesursache „akutes arterielles Verbluten“ erfüllt. Dieses Kollektiv ist als Kontrollgruppe anzusehen.

Um Einflussgrößen, die eine Ischämie vortäuschen können, gering zu halten, wurden weitere Ausschlusskriterien festgelegt. So gelangten weder Fälle mit Diabetes mellitus noch mit Epilepsie in das Untersuchungsgut, da diese Krankheiten zu ähnlichen neuronalen Veränderungen führen können wie eine hypoxische Schädigung [3, 53].

Da Hinweise ergeben, dass sich in höherem Lebensalter Veränderungen des Zytoskeletts ausgeprägter gestalten [57], wurde die Obergrenze des Lebensalters auf 65 Jahre festgelegt. Es erscheint im Fall dieser Studie besonders entscheidend, da die Veränderungen vermutlich auf einer gestörten Calcium-Homöostase beruhen, welche wiederum eine Aktivitätsminderung der Protease Calpain und damit eine verminderte Proteolyse von MAP2 bewirken kann [18]. Darüber hinaus wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen ansteigendem Lebensalter und Nervenzellverlust in der Hilusregion des Ammonshorns nachgewiesen [71], was eine Altersbegrenzung zusätzlich begründet.

Die Leichenliegezeit betrug maximal 48 h, im Durchschnitt etwa 24 h. Keine Berücksichtigung fanden Fälle mit bereits makroskopisch sichtbaren Zeichen einer Fäulnis. Ebenso wenig wurden Fälle eines intravitalen Hirntodes in das Untersuchungsmaterial einbezogen.

Die einzelnen Kollektive mit den jeweiligen Personendaten sind tabellarisch im Anhang A dargestellt.

3.1.2 Neuropathologische Aufbereitung der Gehirne

Sämtliche Gehirne wurden unmittelbar nach der Obduktion im Ganzen in Formalin (4,5 %, gepuffert, mit Natriumchloridzusatz) fixiert. Die Fixierungszeit betrug mindestens 14 Tage und maximal vier Wochen.

Nach der Formalinfixierung erfolgte eine makroskopische Untersuchung sowie eine protokollarische und fotografische Dokumentation. Zur weiteren histologischen Aufarbeitung wurden regelmäßig mindestens folgende Hirnabschnitte entnommen: frontaler Kortex (1./2. Frontalhirnwindung), Stammganglien, Thalamus, Hippokampus, Kleinhirn, Pons und Medulla oblongata. Bei unklaren oder auch eindeutig pathologischen Befunden wurden weitere Gewebeblöcke entnommen. Die ca. 4x2x2 cm großen Gewebeblöcke wurden mit Hilfe des Gewebeent-

wässerungs- und Einbettautomaten Tissue-Tek dehydriert und gemäß Routinemethoden in Paraffin eingebettet.

Die angefertigten Schnittpräparate von ca. 5 µm Dicke wurden mikroskopiert und die Beobachtungen protokolliert oder fallorientiert gutachterlich bewertet ohne Berücksichtigung der Fragestellung dieser Studie. Zur Bewertung standen jeweils folgende Färbungen zur Verfügung: Hämatoxylin und Eosin (HE), Nissl, Luxol Fast Blue und van Gieson.

3.1.3 Anfertigung der Schnittpräparate für die vorliegende Untersuchung

Nach oben beschriebener Fixierung und Einbettung wurden am Schlittenmikrotom ca. 5 µm dünne Paraffinschnitte der Ammonshornformation und der 1./2. Frontalhirnwindung des Gyrus frontalis superior aller in Anhang A aufgeführten Fälle hergestellt.

Die Fixierung erfolgte auf SuperfrostPlus-Objektträger, die sich aufgrund einer speziellen Beschichtung durch die rasche und feste Bindung der Schnitte auszeichnet. Sie verhindert eine Gewebeablösung während der Färbevorgänge und besonders während der unten aufgeführten Mikrowellenbehandlung. Bis zur Entparaffinierung und Färbung wurden die Gewebeschnitte zum Trocknen und damit zur besseren Haftung im Wärmeschrank bei 40 °C aufbewahrt.

3.1.4 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die Antigen-Antikörper-Reaktion am Schnittpräparat ist eine hochspezifische Darstellung eines Antigens. Unter der Fülle von immunenzymatischen Methoden lassen sich vier Färbemethoden abgrenzen, die überwiegend Anwendung finden:

- direkte Methode
- indirekte Methode
- Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) -Methode
- Avidin-Biotin-Methode

In dieser Studie wurde die LSAB(labelled-streptavidin-biotin)-Methode, also markierte Streptavidin-Biotin-Methode, angewendet. Sie ist eine Variation des Avidin-Biotin-Verfahrens, das zur Zeit eine der empfindlichsten Färbemöglichkeiten bei fixiertem, paraffineingebettetem Material darstellt [9, 10]. Diese hohe Empfindlichkeit resultiert aus der äußerst hohen Affinität des Avidins zum Biotin. Das Prinzip dieser LSAB-Methode soll hier kurz dargestellt werden (siehe Abb. 3.1):

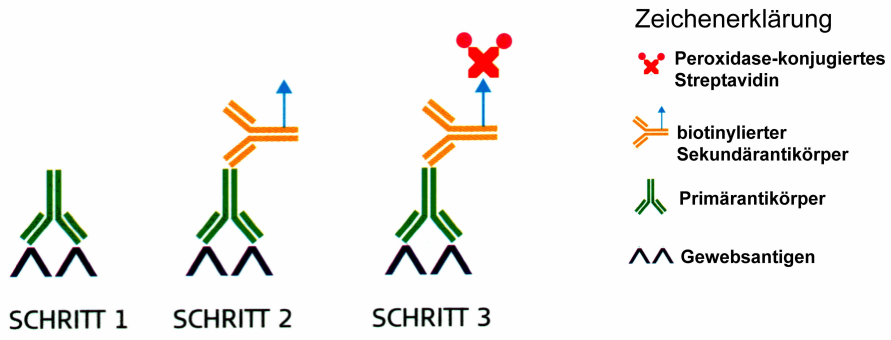

Abbildung 3.1: Die drei Schritte der LSAB-Methode (modifiziert nach [9])

Schritt 1
Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Gewebsantigen.

Schritt 2
Der Sekundärantikörper ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und zusätzlich mit Biotin konjugiert. Er bildet das Verbindungsglied zwischen Erstantikörper und Tertiärreagenz und wird daher auch Brückenantikörper genannt. Durch die Verwendung eines Zweitantikörpers erhöht sich die Empfindlichkeit der Reaktion, da mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können und so als Verstärker fungieren (indirekte Methode).

Schritt 3
Als Tertiärreagenz dient Peroxidase-konjugiertes Streptavidin, das an die Biotinmoleküle des biotinylierten Sekundärantikörpers bindet. Die Peroxidase katalysiert die anschließende Farbreaktion. Das hinzugefügte Chromogen reagiert mit

dem Enzym Peroxidase unter Bildung eines unlöslichen, farbigen Niederschlags. In diesem Fall reagiert Aminoethylcarbazol (AEC) mit roter Farbgebung. Es präzipitiert an der Stelle des Antigens und zeigt so dessen Vorhandensein an. Die Menge des niedergeschlagenen Farbstoffes und damit die Intensität der Reaktion ist proportional zur Menge des vorhandenen Antigens. Zellen, die das Antigen nicht aufweisen, werden durch eine Gegenfärbung im Kontrast dargestellt.

Charakterisierung des verwendeten Primärantikörpers
Als Primärantikörper diente in der vorliegenden Untersuchung **MAP2a,b Ab-2 (Klon AP20)**, ein monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG_1. Der Antikörper Ab-2 (Klon AP20) weist hochspezifisch das Antigen MAP 2a,b – das hochmolekulare Paar (280 kDa) von MAP2 – im Zytoplasma von Dendriten und Nervenzellkörpern nach. Er zeigt keine Kreuzreaktion mit MAP1, MAP5, Tubulin oder Tau, ebenso wenig mit der niedrigmolekularen Form MAP2c (70 kDa). Der Klon AP20 wurde 1994 klassifiziert [27]: das korrespondierende Epitop beinhaltet die Aminosäuren 995–1332 im humanen MAP2-Molekül. Als Immunogen diente Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus Rinderhirn, die Gewinnung erfolgte aus Mäuseaszites. Hergestellt wurde der Antikörper von Neomarkers, Inc., Fremont/USA (Katalog-Nr.: MS-249-P), bezogen über die Dianova GmbH Hamburg (Katalog-Nr.: 08582).

3.1.5 Darstellung des MAP2-Antigens am Hirnschnitt

Sämtliche Hersteller und Ansätze der Chemikalien ebenso wie die Hersteller der Geräte sind dem Anhang C zu entnehmen.

1. **Entparaffinieren und Rehydrieren**: die Objektträger für 3 x 10 min im frischen Xylolbad spülen, dann jeweils 5 min in absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %, 96 %, 80 %, 70 % Ethanol) und in Aqua dest. spülen

2. **Antigen-Demaskierung** durch Überführung des Objektträgers in Zitronensäure (pH = 6,0), dann Erhitzen in der Mikrowelle: pro Küvette 1 min bei 800 W, dann 9 min bei 90 W

3. **Auskühlen** bei Raumtemperatur für 10 min

4. **Spülen mit Aqua dest.** für 5 min

5. **Spülen mit Tris-Puffer** für 5 min
6. **Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität** durch Spülen in 3 % H_2O_2 für 20 min
7. **Spülen mit Tris-Puffer** für 5 min
8. **Inkubation mit Primärantikörper** MAP 2a,b Ab-2 (Verdünnung 1:100 mit Ak-Verdünnungspuffer) in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 60 min
9. **Spülen mit TRIS-Puffer** für 5 min
10. **Inkubation mit Sekundärantikörper**: biotinkonjugierter Ziege-Anti-Maus-Ak (Verdünnung 1:2000 mit Ak-Verdünnungspuffer) in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 30 min
11. **Spülen mit Tris-Puffer** für 5 min
12. **Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin** (Verdünnung 1:500 mit Tris-Puffer) in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 30 min
13. **Spülen mit Tris-Puffer** für 5 min
14. **Sichtbarmachen der Peroxidase** durch eine Farbreaktion mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) bei Raumtemperatur unter mikroskopischer Kontrolle
15. **Abstoppen der Farbreaktion** in Aqua dest.
16. **Kerngegenfärbung** mit Hämalaun nach Mayer für 30 sec
17. **Bläuen** unter fließendem Leitungswasser für 5 min, dann Überführen in Aqua dest.
18. **Eindecken** der gefärbten Objektträger aus Aqua dest. mit Aquatex

Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Eine Positivkontrolle ist eine Gewebeprobe, die das gesuchte Antigen sicher exprimiert. Bei der Negativkontrolle wurde bei sonst gleicher Behandlung kein Primärantikörper hinzugefügt. So lassen sich falsch positive bzw. falsch negative Proben ausschließen.

3.2 Histologie der untersuchten Regionen

3.2.1 Histologische Struktur der Ammonshornformation

Größtenteils vom Gyrus parahippocampalis überlagert, liegt der Hippokampus an der medialen Fläche des Temporallappens. Erst auf Frontalschnitten wird seine innere Struktur sichtbar. Die hippokampale Rinde bildet ein eingerolltes Band, das Ammonshorn (Cornu ammonis), das sich gegen den Seitenventrikel vorwölbt. Dieses Rindenzellband wird anhand seiner Breite, Zellgröße und Zelldichte in vier Abschnitte eingeteilt: die Segmente CA1 bis CA4 (siehe Abb. 3.2).

Umgeben vom Gyrus dentatus, einem dichten Zellband, befindet sich die aufgelockert wirkende **CA4**-Region, auch Hilus genannt. Sie geht in ein breites lockeres Band großer Pyramidenzellen über: die **CA3**-Region. Daran schließen sich die großen Nervenzellen der **CA2**-Region an, die aufgrund ihrer dichten Anordnung dem Rindenband in diesem Bereich ein schmales Aussehen verleihen. Die kleinen Pyramidenzellen der **CA1**-Region bilden den Abschluss des Zellbandes und gehen in das Subiculum über, dem Übergangsgebiet zwischen Ammonshorn und entorhinaler Rinde.

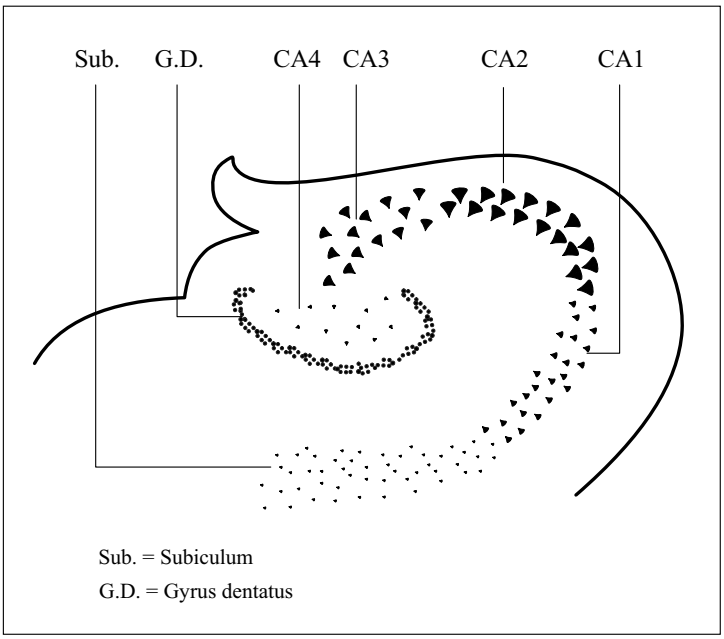

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Regionen der Ammonshornformation

Aufgrund der erhöhten Vulnerabilität gegenüber Sauerstoffmangel, wurde die Ammonshornregion für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt (siehe Kapitel 1.5.1 und 1.5.3).

3.2.2 Histologische Struktur des Neokortex

Die 2–5 mm dicke Schicht an der Oberfläche des Großhirns wird als Großhirnrinde oder Cortex cerebri bezeichnet, an die sich zentral das Großhirnmark anschließt. Entwicklungsgeschichtlich lassen sich drei Rindenformen unterscheiden: Archikortex, Palaeokortex und Neokortex.

Der Neokortex, wegen seines gleichförmigen Aufbaus auch Isokortex genannt, ist die entwicklungsgeschichtlich jüngste Rindenart und bildet bei den Säugetieren sowie beim Menschen den größten Anteil der Rinde. Der Neokortex ist durch einen sechsschichtigen Aufbau charakterisiert (siehe Abb. 3.3):

I. **Die Molekularschicht** (Lamina molecularis) liegt an der Hirnoberfläche und grenzt an die Pia mater. Sie besitzt keine Pyramidenzellen, aber locker verteilt kleine Neurone. Die Schicht ist reich an Nervenzellausläufern, Synapsen, Gliazellen und Cajal-Zellen.

II. **Die äußere Körnerschicht** (Lamina granularis externa) besteht aus kleinen, sehr dicht gedrängten Pyramidenzellen.

III. **Die äußere Pyramidenschicht** (Lamina pyramidalis externa) ist die breiteste Schicht. Ihre Zellen stehen aufgelockert und werden markwärts größer.

IV. **Die innere Körnerschicht** (Lamina granularis interna) setzt sich aus dicht gelagerten kleinen, rundlichen Nervenzellen zusammen.

V. **Die innere Pyramidenschicht** (Lamina pyramidalis interna) enthält große Pyramidenzellen, die in der motorischen Rinde als Betz´sche Riesenzellen hervorstechen. In einigen Hirnarealen sind die Nervenzellen dieser Schicht allerdings kleiner als diejenigen der äußeren Pyramidenschicht.

VI. **Die multiforme Schicht** (Lamina multiformis) zeigt Zellen unterschiedlicher Morphologie, vor allem dreieckige und spindelförmige Zellen. Sie läuft ohne scharfe Grenze ins Marklager aus.

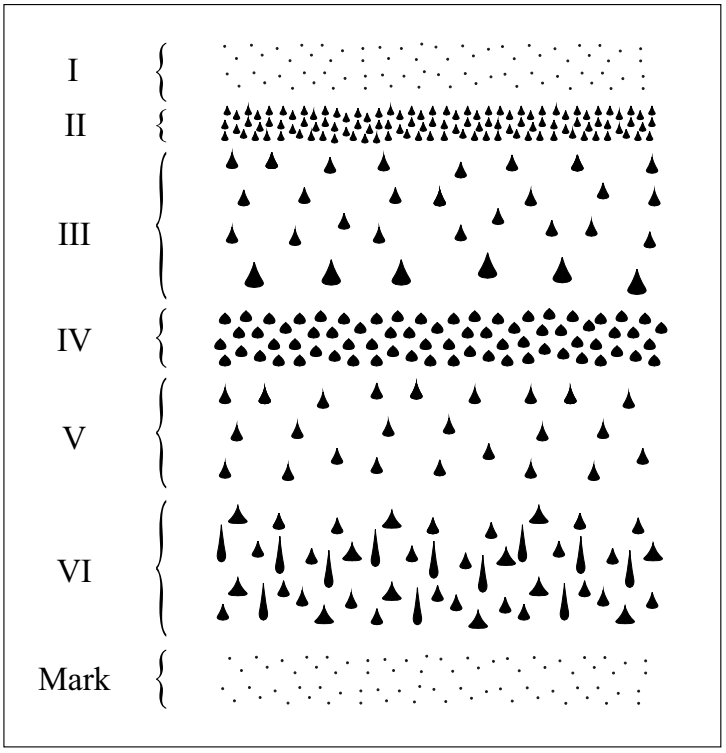

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Rindenschichten des Neokortex

Diese sechs Kortexschichten sind in einzelnen Rindenarealen unterschiedlich stark ausgeprägt. So findet man in sensibel-sensorischen Rindengebieten einen so genannten granulären Kortex mit stark ausgeprägten Körnerschichten und schwach entwickelten Pyramidenschichten. In den motorischen Arealen überwiegen hingegen die Pyramidenschichten bei schwacher bis fehlender Ausbildung der Körnerschichten. Man spricht hier von einem agranulären Kortex.

Die untersuchten Hirnareale in dieser Studie entstammen einheitlich der ersten und zweiten Frontalhirnwindung. In dieser Region sind alle sechs Kortexschichten gut abzugrenzen. Es wurden nur die Gebiete um das Windungstal ausgezählt, da hier aufgrund der Blutversorgung durch Endarterien der Arteria cerebri anterior und Arteria cerebri media die Sauerstoffversorgung besonders kritisch ist und somit in dieser so genannten Wasserscheide am frühesten ischämisch geschädigte Nervenzellen beobachtet werden können [67].

3.3 Quantifizierung und Auswertung

3.3.1 Quantifizierung der Antigenexpression

Unter der Annahme, dass hypoxisch/ischämisch geschädigte Nervenzellen kein MAP2 exprimieren, lassen sich folgende Zelltypen unterscheiden:

1. MAP2-exprimierende Neurone, die durch stattgefundene Antigen-Antikörper-Reaktion einen roten Farbniederschlag aufweisen und demnach keine ischämische Schädigung anzeigen,

2. MAP2-negative Neurone, die den verwendeten Antikörper und den Farbstoff nicht gebunden haben und demnach hypoxisch geschädigt sind.

Es erfolgte eine prozentuale Erfassung der das Antigen exprimierenden Nervenzellen jeweils gleicher Topographie: Bei 160 facher Vergrößerung wurden in jedem der Segmente CA1 bis CA4 der Ammonshornregion und in jeder der Schichten II bis VI der Großhirnrinde jeweils 100 Nervenzellen ausgezählt. Um sicher zu stellen, dass nur Zellen gleicher Ebene erfasst wurden, fanden dabei nur die Neurone mit angeschnittenem Nukleolus Berücksichtigung. Als positiv bezüglich der MAP2-Expression zählten jene Zellen, die im Vergleich zur Positivkontrolle eine mindestens ebenso starke Anfärbung der Nervenzellen aufwiesen. Mit Hilfe des AssistentCounter wurde dabei das Verhältnis nicht exprimierender und MAP2-exprimierender Neurone ermittelt. Für die statistischen Auswertungen wurde am Ende der Anteil MAP2-positiver Zellen zugrunde gelegt.

3.3.2 Statistische Auswertung

Ziel der Studie war es, die MAP2-Expression zwischen Kollektiven akuten Todes und Tod durch Hypoxie, sowie verschiedene Hypoxiegruppen untereinander zu vergleichen. Grundlage war dabei der Anteil MAP2-positiver Neurone an allen ausgezählten Nervenzellen der jeweiligen Region.

Zur Auswahl eines geeigneten statistischen Tests wurden die Regionen sämtlicher Fallgruppen auf Normalverteilung getestet: dabei zeigte die Lilliefors-Modifikation des Kolmogorov-Smirnov-Tests größtenteils keine normalverteilten Werte, was in den folgenden Berechnungen Berücksichtigung fand. Dem Signifikanzniveau lag für den Friedman-Test, den H-Test und den unkorrigierten U-Test eine

Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0{,}05$ zugrunde. Die Bonferroni-Korrektur ergab für den Wilcoxon-Test zur Untersuchung der Hirnrindenschichten eine korrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0{,}005$, für den Wilcoxon-Test zum Vergleich der Ammonshornregionen und für den korrigierten U-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0{,}008$. Folgende Tests fanden Anwendung:

Friedman-Test
Der Friedman-Test findet bei einem Vergleich von mehr als zwei abhängigen Stichproben Anwendung, also bei der Fragestellung, ob sich die vier Ammonshornregionen und fünf Rindenschichten bezüglich der Anzahl MAP2-positiver Zellen innerhalb der gleichen Fallgruppe unterscheiden.

Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur
Der Bonferroni-korrigierte Wilcoxon-Test dient als Post-hoc-Test, also Folgetest, bei signifikanten Ergebnissen des Friedman-Tests. Hierbei werden die abhängigen Stichproben paarweise verglichen, um zu erkennen, welche der untersuchten Regionen sich signifikant voneinander unterscheiden.

H-Test nach Kruskal und Wallis
Der H-Test vergleicht mehr als zwei unabhängige Stichproben. Er prüft, ob sich die verschiedenen Fallgruppen bezüglich der Anzahl MAP2-positiver Zellen signifikant voneinander unterscheiden.

U-Test nach Mann und Whitney mit Bonferroni-Korrektur
Dieser Post-hoc-Test des signifikanten H-Tests vergleicht paarig zwei unabhängige Stichproben, er prüft also, welche der Fallgruppen signifikant unterschiedlich sind. Außerdem diente er dem Vergleich zwischen der Gruppe „Akutversterben“ und der Gruppe „Tod durch Ersticken“, zusammengesetzt aus den Kollektiven 2-4.

Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11.0 (SPSS GmbH, München), ebenso wie die graphischen Darstellungen der Ergebnisse mittels Boxplots (siehe Kapitel 4.2). Die statistische Auswertung basiert auf den Lehrbüchern von Bühl und Zöfel [13] sowie von Sachs [54].

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Qualitative Auswertung der Schnittpräparate nach MAP2-Färbung

4.1.1 Pathologische Veränderungen

Bei eingehender makroskopischer und histologischer Untersuchung der Schnittpräparate zeigten sich keine Anzeichen für Missbildungen, Entwicklungsstörungen bzw. für akute herdförmige Veränderungen wie Blutung, Erweichung oder Entzündung. Auch Fasergliose oder zystische Markumwandlungen als Ausdruck chronisch-hypoxischer Schädigung ließen sich nicht nachweisen. Als histologisches Korrelat einer reversiblen Zellschädigung waren hydropisch geschwollene Zellen zu beobachten, während Zellnekrosen als Zeichen eines irreversiblen Schadens nur in Einzelfällen sichtbar wurden.
Diese geringen morphologischen Veränderungen ließen jedoch keine Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit zu den untersuchten Kollektiven erkennen, d.h. eine diagnostische Zuordnung war in diesen Fällen nicht möglich.

4.1.2 Färbeverhalten und fotografische Darstellung

Mikroskopische Störfaktoren wie Hintergrundfärbung oder Artefakte waren nicht immer vollständig zu vermeiden; sie konnten jedoch gegen den Farbniederschlag bei positiv reagierenden Nervenzellen gut abgegrenzt werden. Bei der mikroskopischen Untersuchung war eine scharfe Abgrenzung von reagierenden (MAP2-positiven) und nicht reagierenden (MAP2-negativen) Neuronen – bis auf wenige Ausnahmen – ohne Schwierigkeiten möglich.

Bei der Betrachtung der Schnittpräparate verschiedener Kollektive zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede in der Intensität des Farbniederschlags. So wies ein Großteil der Präparate der Gruppe Akutversterben bereits makroskopisch einen intensiv roten Farbniederschlag als Ausdruck einer MAP2-Expression in Soma und Dendriten der Nervenzellen auf. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die Hirnschnitte der Hypoxiegruppen, insbesondere der Gruppe CO-Intoxikation, durch einen deutlich verminderten Farbniederschlag aus.

Erkennbar wird in Abb. 4.1 die Großhirnrinde eines Kontrollfalls mit unterschiedlich dichtem neuronalen Besatz, wobei sich fast alle Neurone als MAP2-positiv erwiesen. Zwar war ein derartig ausgeprägtes Reaktionsverhalten vereinzelt auch bei Hypoxiefällen nachzuweisen, wie in der Ammonshornformation der Abb. 4.2 demonstriert, allerdings wies der Großteil der Hypoxiefälle eine deutliche Reduktion MAP2-positiver Neurone auf: Hier traf man zwischen MAP2-positiven auch vermehrt MAP2-negative Neurone an (Abb. 4.3). In Einzelfällen waren ganze Segmente durch einen Verlust an MAP2-positiven Neuronen gekennzeichnet (Abb. 4.4).

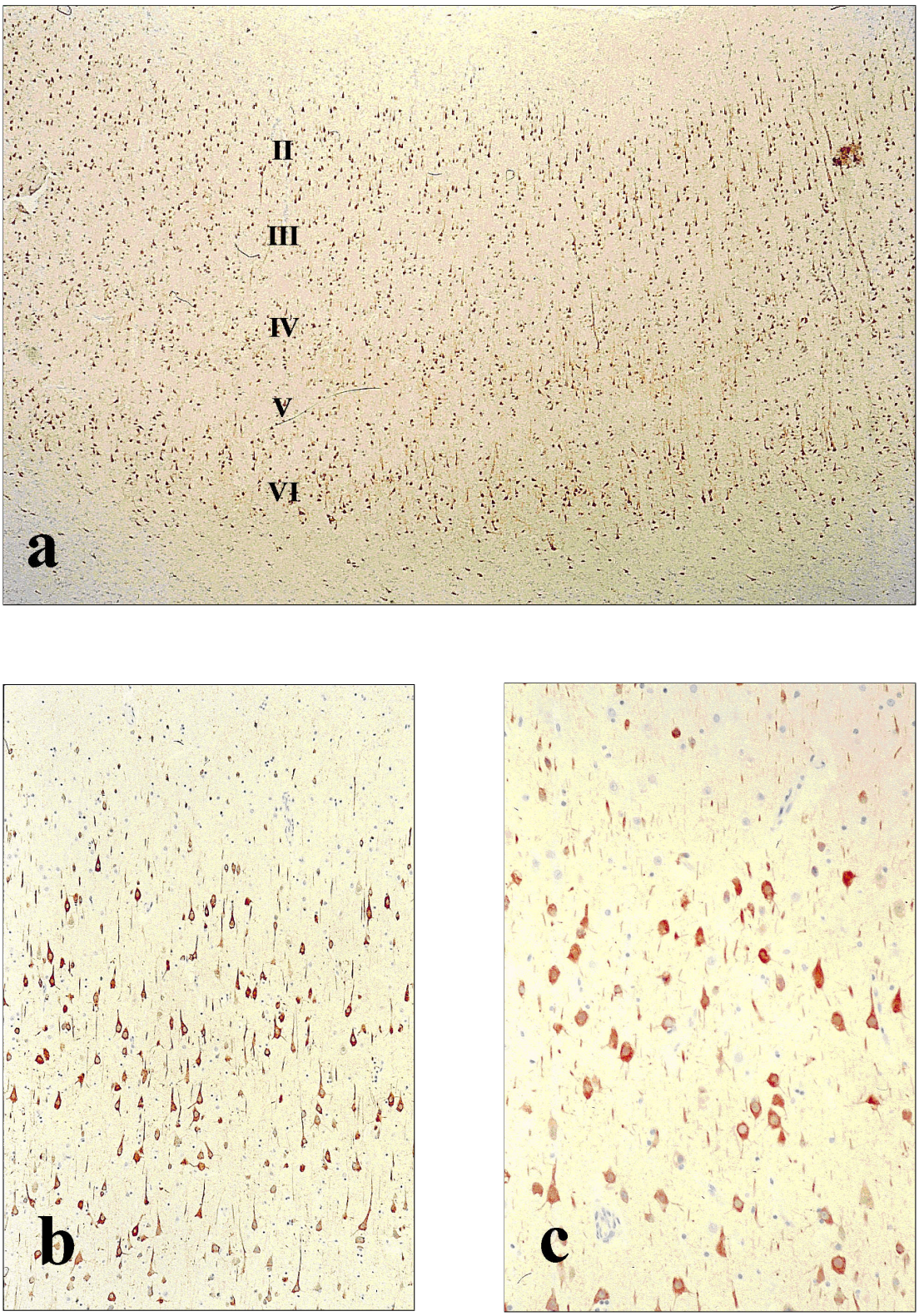

Abbildung 4.1: Fotografische Darstellung von Nervenzellen (NZ) der Großhirnrinde eines Kontrollfalls (S 158/01) mittels MAP2-Immunreaktivität: a) deutlich erkennbare Schichtung der Großhirnrinde (Vergrößerung 25x), b) dichter Besatz MAP2-positiver NZ in Schicht II (Vergrößerung 100x), c) Detaildarstellung MAP2-positiver NZ in Schicht II (Vergrößerung 200x)

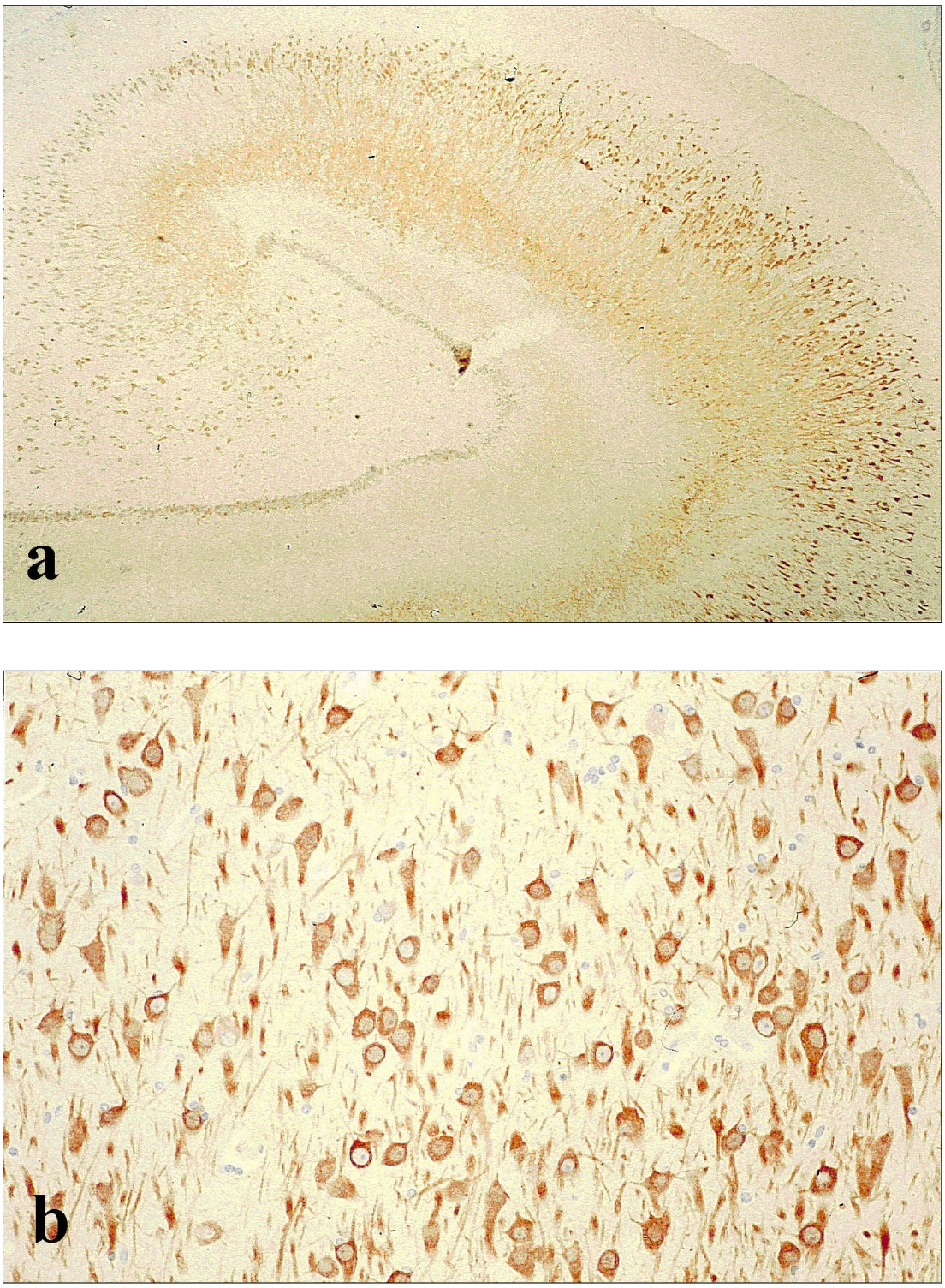

Abbildung 4.2: Fotografische Darstellung von Nervenzellen (NZ) der Ammonshornregionen zweier Hypoxiefälle (Tod durch Ertrinken) mittels MAP2-Immunreaktivität: a) unterschiedlich dichter Besatz MAP2-positiver NZ in den einzelnen Ammonshornsegmenten (S 188/97, Vergrößerung 25x), b) Detailansicht MAP2-positiver NZ im Ammonshornsegment CA2 (S 197/01, Vergrößerung 200x)

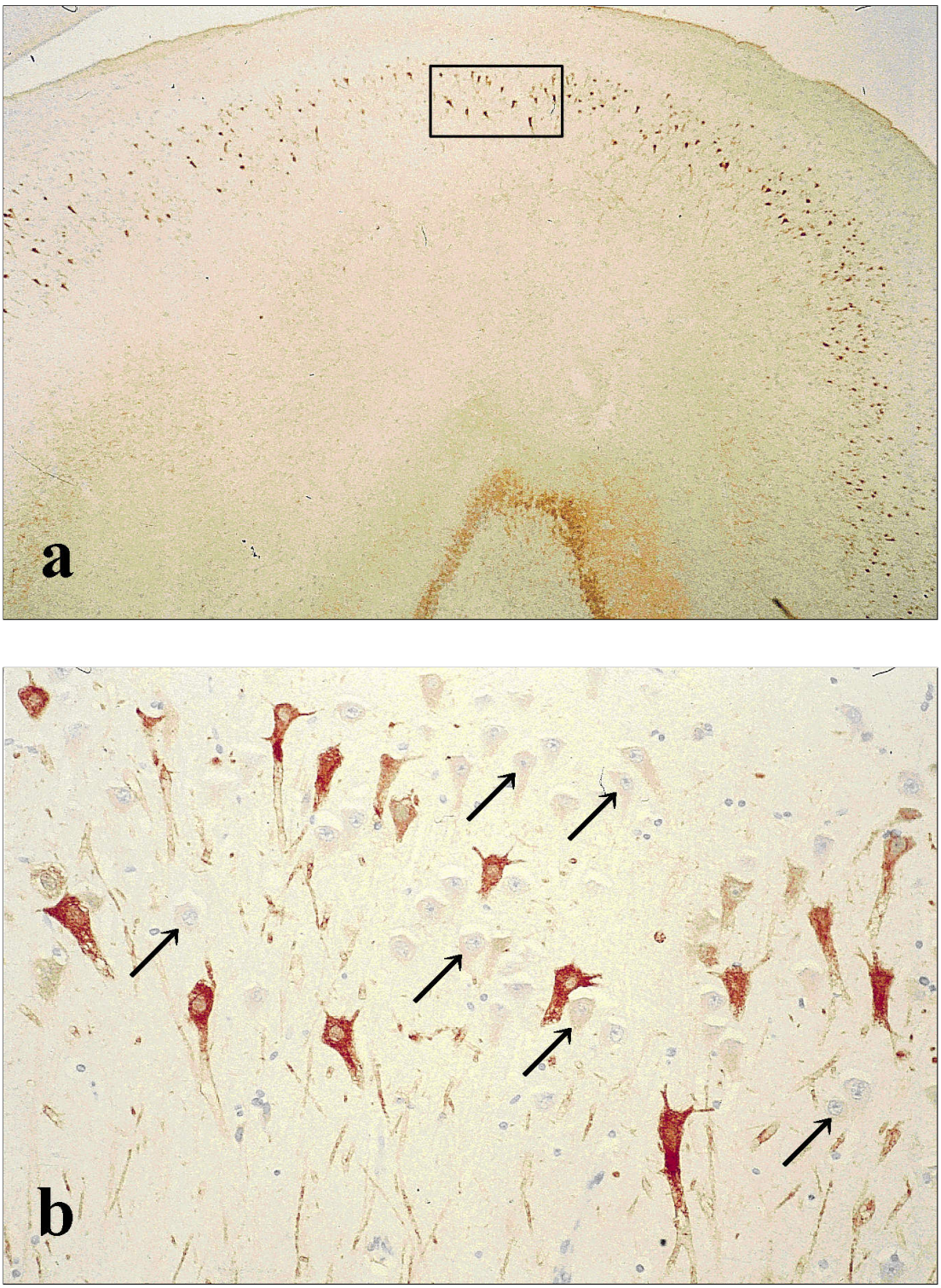

Abbildung 4.3: Fotografische Darstellung von Nervenzellen (NZ) der Ammonshornregion eines Hypoxiefalls (Tod durch Erhängen S 30/97) mittels MAP2-Immunreaktivität: a) Nebeneinander von MAP2-positiven und MAP2-negativen NZ in der Übersicht (Vergrößerung 25x), b) Detailansicht MAP2-positiver und MAP2-negativer (Pfeile) NZ in Segment CA1 (Vergrößerung 200x) entsprechend dem Ausschnitt in Abbildung a)

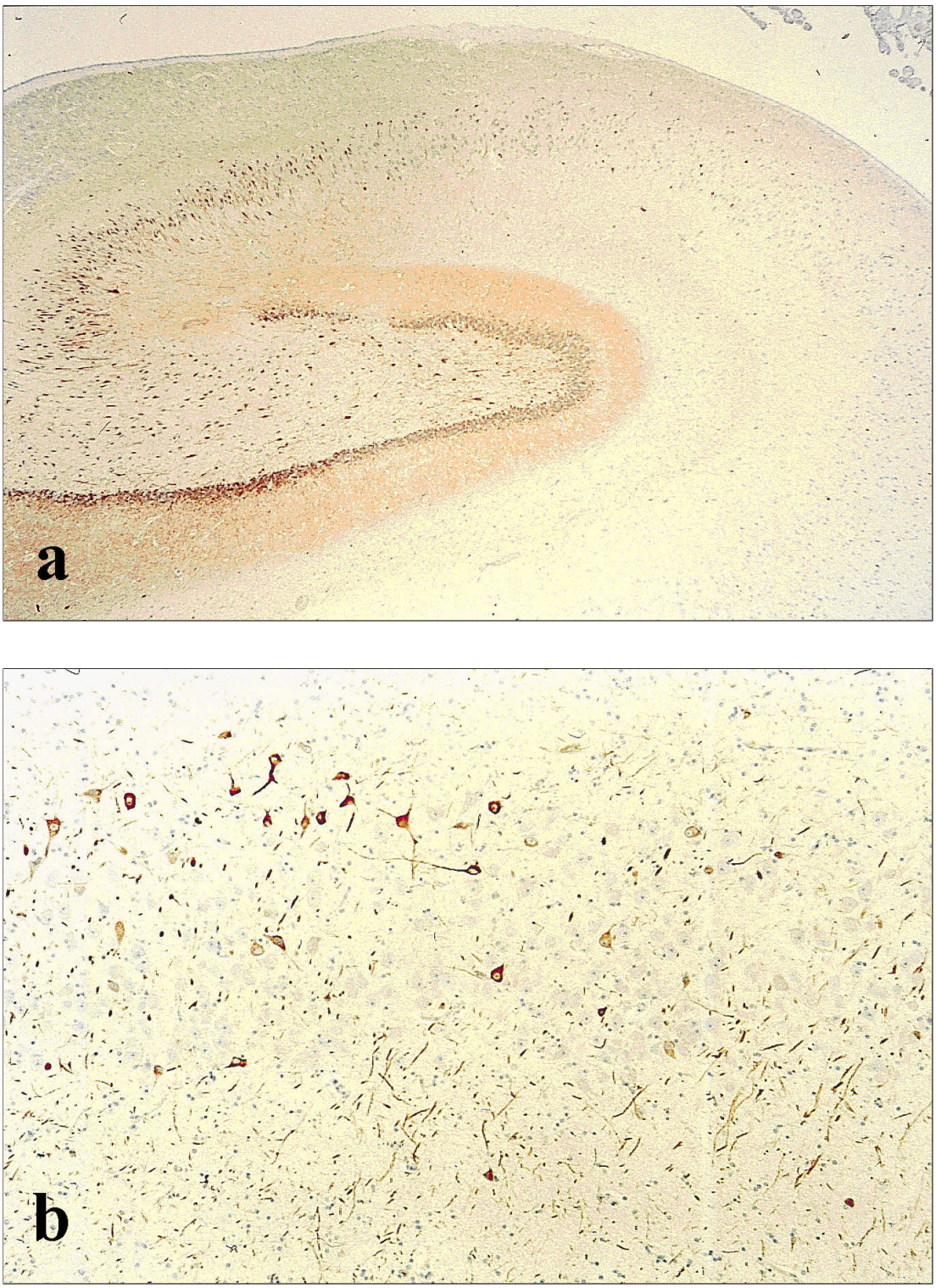

Abbildung 4.4: Fotografische Darstellung von Nervenzellen der Ammonshornregion mittels MAP2-Immunreaktivität. Sichtbare segmentale Ausfälle beim Übergang von Segment CA2 zu Segment CA1 bei einem Kontrollfall (Abb. (a), Akutversterben, S 86/95, Vergrößerung 25x) und einem Hypoxiefall (Abb. (b), Tod durch Erhängen, S 10/02, Vergrößerung 100x)

4.2 Quantitative Auswertung der MAP2-Expression

Wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben, wird bei ischämisch-hypoxischer Schädigung des Gehirns eine Reduktion MAP2-exprimierender Neurone angenommen. Dieses lässt sich durch Vergleich von Nervenzellen mit bzw. ohne Farbniederschlag nach Reaktion mit farbgekoppeltem MAP2-Antikörper quantifizieren. Die folgenden Ergebnisse beruhen auf den in Kapitel 3.3.2 beschriebenen statistischen Tests, basierend auf dem Verhältnis von MAP2-positiven (also Farbniederschlag aufweisenden) zu MAP2-negativen Neuronen.

Zur graphischen Verdeutlichung sind Boxplots in die jeweiligen Gegenüberstellungen der Kollektive eingegliedert; dargestellt werden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum. Die Einzelergebnisse des Anteils MAP2-positiver Neurone nach Auszählung von je 100 Nervenzellen sind dem Anhang B zu entnehmen, ebenso wie die statistische Signifikanz.

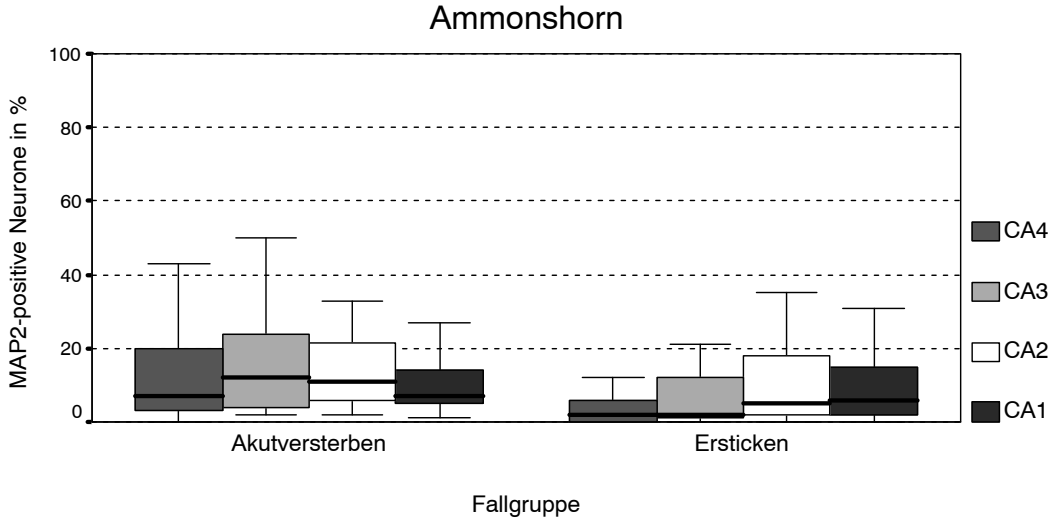

Abbildung 4.5: Ammonshorn - Synopsis der MAP2-Expression des Kollektivs Ersticken im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Boxplots)

4.2.1 Vergleich der Kollektive Akutversterben und Ersticken

Ammonshorn (Abb. 4.5)

Beim Vergleich mittels U-Test wurde dem Kollektiv Akutversterben das Kollektiv Ersticken gegenübergestellt. Die Gruppe durch Ersticken Verstorbener umfasst hierbei die Kollektive 2–4 (Erhängen, Ertrinken, CO-Intoxikation), die sich durch eine zum Teil erhebliche Reduktion MAP2-positiver Neurone auszeichnet: In den Regionen CA2–CA4 dieser Gruppe exprimierten signifikant weniger Neurone MAP2 im Vergleich zu Akutverstorbenen. Der größte Rückgang wurde dabei in der Region CA4 registriert. Das Färbeverhalten der CA1 Neurone unterschied sich nicht signifikant von der Vergleichspopulation in den Kontrollfällen.

Frontale Großhirnrinde (Abb. 4.6)

Beim Vergleich der Rindenschichten II bis VI der frontalen Großhirnrinde zeigten sich durchweg signifikant mehr MAP2-positive Neurone in den Kontrollfällen als im Erstickungskollektiv. Das Erstickungskollektiv wies dabei in jeder der Rindenschichten einen deutlichen Verlust an MAP2-exprimierenden Nervenzellen auf. Die größten Verluste zeigten sich dabei in den Schichten III–V.

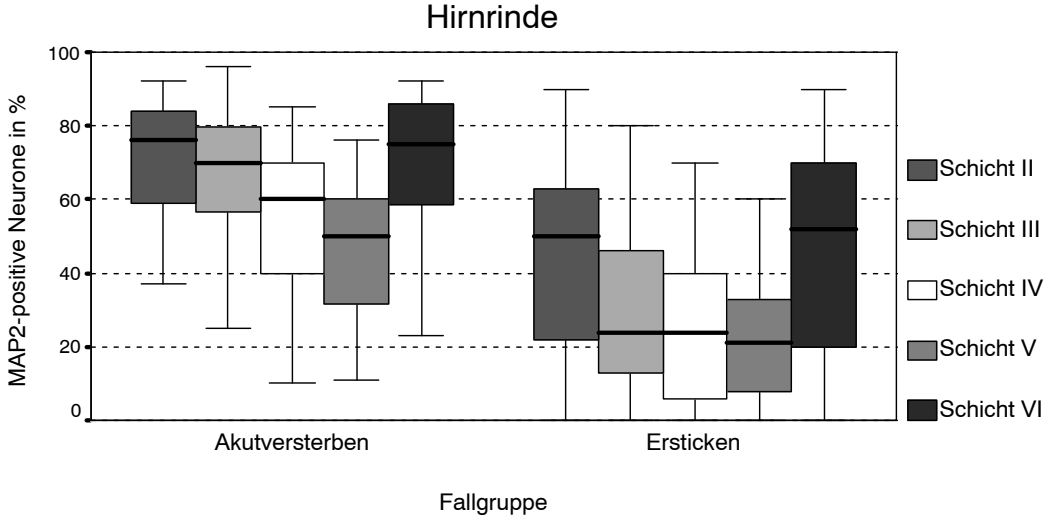

Abbildung 4.6: Großhirnrinde – Synopsis der MAP2-Expression des Kollektivs Ersticken im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Boxplots)

4.2.2 Detaillierter Vergleich des Kontrollkollektivs mit den Kollektiven Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation

Ammonshorn (Abb. 4.7)

Das Kollektiv Akutversterben wurde mithilfe des Bonferroni-korrigierten U-Tests zu den Gruppen Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation in Beziehung gesetzt, wobei die quantitativen Ergebnisse der unterschiedlichen Segmente (CA1–CA4) getrennt aufgeführt und jeweils gegen die Kontrollfälle getestet wurden. Bei der Gegenüberstellung mit der Gruppe Erhängen zeichnete sich diese durch einen signifikant niedrigeren Prozentsatz an MAP2-positiven Neuronen in der Region CA4 aus. Beim Vergleich mit dem Kollektiv Ertrinken unterschied sich keines der vier Segmente signifikant von den entsprechenden Segmenten des Kontrollkollektivs. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Kollektiv CO-Intoxikation in allen untersuchten Ammonshornsegmenten ein signifikant geringerer Prozentsatz MAP2-positiver Neurone als in der Kontrollgruppe.

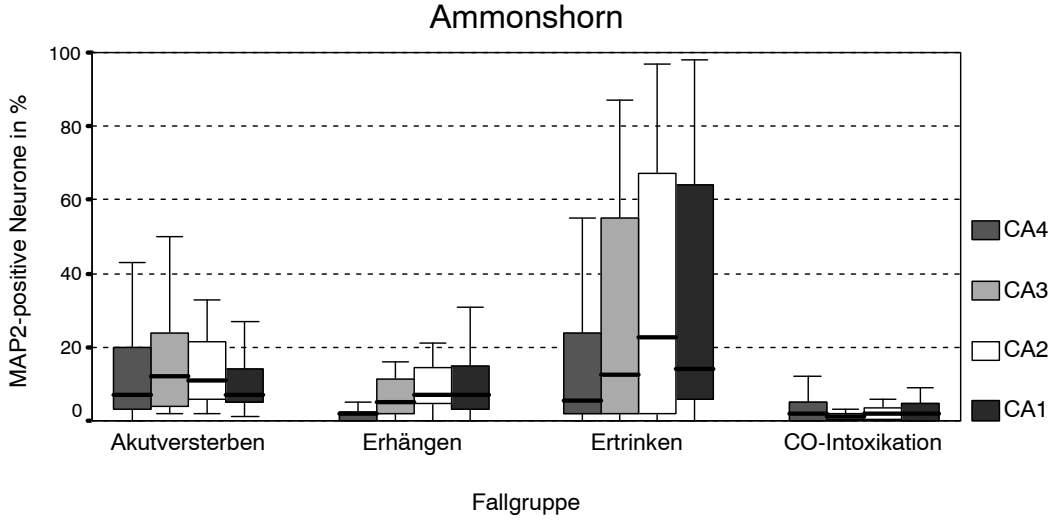

Abbildung 4.7: Ammonshorn – Synopsis der MAP2-Expression einzelner Erstickungskollektive im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Boxplots)

Frontale Großhirnrinde (Abb. 4.8)

Nahezu alle untersuchten Hirnrindenschichten der Kollektive Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation zeigten eine signifikant geringere Anzahl MAP2-positiver Neurone im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Eine Ausnahme bildeten die Rindenschichten II und VI der Gruppe Erhängen, in denen sich kein signifikanter Unterschied ergab.

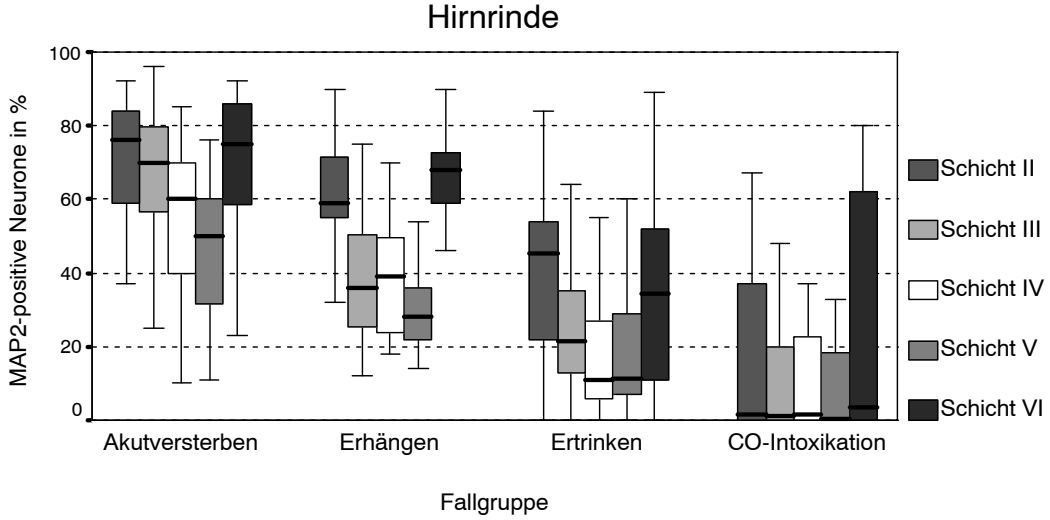

Abbildung 4.8: Großhirnrinde – Synopsis der MAP2-Expression einzelner Erstickungskollektive im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Boxplots)

4.2.3 Vergleich der einzelnen Erstickungskollektive untereinander

Ammonshorn (Abb. 4.7)

Der Vergleich der Kollektive Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation untereinander mithilfe des korrigierten U-Tests ergab folgende Ergebnisse:
Das Kollektiv Erhängen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Gruppe Ertrinken, jedoch eine signifikant größere Anzahl MAP2-positiver Neurone als bei CO-Intoxikation in den Segmenten CA1 und CA2. Bei der Gegenüberstellung der Kollektive CO-Intoxikation und Ertrinken war hingegen nur im Ammonshornsegment CA1 bei CO-Vergiftung eine signifikant niedrigere Anzahl MAP2-positiver Neurone festzustellen.

Frontale Großhirnrinde (Abb. 4.8)

Im Kollektiv Erhängen zeigte sich eine signifikant größere Anzahl MAP2-positiver Neurone in den Schichten II und VI gegenüber der Gruppe Ertrinken und in den Schichten II bis V gegenüber der Gruppe CO-Intoxikation. Bei der Gegenüberstellung der letztgenannten Kollektive - Ertrinken und CO-Intoxikation - ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

4.2.4 Vergleich der Regionen innerhalb eines Kollektivs

Ammonshorn (Abb. 4.7)

Mit dem Bonferroni-korrigierten Wilcoxon-Test wurde jedes der Kollektive Akutversterben, Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation für sich auf unterschiedliches Reaktionsverhalten der Neurone in den einzelnen Segmenten geprüft.

Dabei zeigte sich, dass weder im Kollektiv Akutversterben noch im Kollektiv CO-Intoxikation eine signifikant unterschiedliche Anzahl an MAP2-positiven Neuronen in den einzelnen Ammonshornsegmenten nachweisbar war. In dem Kollektiv Erhängen exprimierten in Sektor CA4 signifikant weniger Neurone MAP2 als in den Segmenten CA1–CA3. Im Kollektiv Ertrinken unterschied sich ebenfalls das Gebiet CA4 vom Gebiet CA1 durch signifikant geringere Anzahl MAP2-exprimierender Neurone.

Frontale Großhirnrinde (Abb. 4.8)

In der Gruppe Akutversterben stellte sich die Anzahl MAP2-exprimierender Neurone in den Rindenschichten IV und V signifikant geringer dar als in den Schichten II, III und VI. Auch im Kollektiv Erhängen zeichneten sich die Schichten IV und V sowie zusätzlich die Schicht III durch signifikant geringere Anzahl MAP2-positiver Neurone aus, im Vergleich zu den übrigen Rindenschichten II und VI. Das Kollektiv Ertrinken enthielt ebenfalls in den Schichten IV und V signifikant weniger MAP2-positive Neurone als in der Schicht II. Außerdem unterschied sich die Rindenschicht IV durch eine verminderte Anzahl MAP2-exprimierender Neurone signifikant von Schicht VI. In der Gruppe CO-Intoxikation konnte innerhalb der Rindenschichten kein signifikant unterschiedliches Reaktionsverhalten der Neurone nachgewiesen werden.

4.2.5 Vergleich der MAP2-Expression in Abhängigkeit von der Überlebenszeit

Während der Untersuchungen wurde deutlich, dass für das Kollektiv 5, also kurzzeitig überlebte Hypoxie/Ischämie, nur wenige Fälle zur Verfügung standen, die die Auswahlkriterien erfüllten. Dennoch wurden die ermittelten neun Fälle den Untersuchungen unterzogen, um eine mögliche Tendenz zu beobachten (Tabelle A.3 und B.6). Die geringe Fallzahl lässt jedoch keine Anwendung statistischer Tests und daraus resultierende repräsentative Ergebnisse zu. Tendenziell wies diese Gruppe eine verminderte MAP2-Expression auf. Eine Abhängigkeit der Anzahl MAP2-positiver Neurone von dem überlebten Zeitintervall ließ sich allerdings nicht nachweisen.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 MAP2 als potentieller Hypoxiemarker

5.1.1 Literaturlage

Um den Anforderungen zu genügen, die an einen verlässlichen forensischen Hypoxiemarker gestellt werden, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- früher Nachweis hypoxischer bzw. ischämischer Zellveränderungen
- spezifisches Reaktionsverhalten
- Reproduzierbarkeit.

Ob das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) diesen Anforderungen gerecht wird, war Gegenstand einiger Studien der letzen Jahre. Der Nachweis erfolgte mittels hochspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktion, doch das zeitliche Reaktionsverhalten wurde zum Teil kontrovers diskutiert. So demonstrierten Arbeitsgruppen eine Reduktion der Zahl MAP2-positiver Nervenzellen nach einer Ischämiezeit von nur 5–10 min [7, 32, 34, 65, 76] oder wiesen subzelluläre Veränderungen nach ebenso kurzer Zeit elektronenmikroskopisch nach [74]. Andere Studien stellten Reaktionszeiten von 1–3 Tagen entgegen, kritisierten die uneinheitlichen Färbeergebnisse beim MAP2-Nachweis und die daraus resultierende mangelnde Verlässlichkeit bzw. Vergleichbarkeit [17, 39, 66].

Allerdings basieren sämtliche Ergebnisse der genannten Arbeitsgruppen – mit Ausnahme von Bernaudin et al. [7], die an Mäusezellkulturen forschten – auf Hirnuntersuchungen an **Ratten** oder **Wüstenrennmäusen** (Gerbils). Dabei zeigten sich die Gehirne der Rennmäuse als deutlich empfindlicher gegenüber Sauerstoffmangel im Vergleich zu Rattenhirnen [39, 65, 66]. Eine mögliche Erklärung lieferten Tomioka et al. [66] mit dem Hinweis, die Wüstenrennmäuse hätten in be-

stimmten Ammonshornregionen besonders fragile Dendriten und zusätzlich bestünden Unterschiede im zerebralen Blutfluss und im Verlauf der Hirnarterien gegenüber Ratten. Dieses unterschiedliche Färbeverhalten bezüglich des MAP2-Antikörpers zwischen verschiedenen Tierspezies wirft die Frage auf, inwieweit sich die Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen. Es liegen nur wenige veröffentlichte Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von MAP2 bei Sauerstoffmangel am menschlichen Gewebe vor [2, 37, 49] und keine untersucht ein größeres forensisches Kollektiv mit nach Todesursache aufgeschlüsselten Hypoxie- bzw. Ischämiegruppen. Somit müssen die eigenen Ergebnisse größtenteils im Vergleich mit Ergebnissen der Tierversuche erörtert werden.

Eine Forderung, die von einigen Autoren gestellt wird, ist die **Reperfusion** nach Ischämie bzw. die Reoxygenierung nach Hypoxie. Nur unter dieser Bedingung seien selektive Verluste von MAP2 sichtbar [17, 44, 70]. Begründet wird diese Voraussetzung durch die Entstehung freier Radikale mit nachfolgender Membranschädigung bzw. durch verstärkte Prostaglandinausschüttung mit resultierender Störung der Piazirkulation [14, 21, 25]. Auch die Bereitstellung von Energieträgern für nachfolgende reaktive Veränderungen wird in diesem Zusammenhang diskutiert [28] (siehe Kapitel 1.5.3). Doch auch diesen Erkenntnissen werden Forschungsberichte entgegengestellt, die von frühen selektiven MAP2-Ausfällen bei Ischämie ohne Reperfusion berichten [65, 74, 76], wie es auch in dieser Studie der Fall war.

5.1.2 Einordnung eigener Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich den Forschungsergebnissen jener Autoren zuordnen, die frühe Sauerstoffmangelveränderungen in Form eines Verlustes der MAP2-Expression von Nervenzellen nachwiesen – auch ohne anschließende Reperfusion.

In der Gegenüberstellung des Gesamtkollektivs eines Erstickungstodes mit dem Kontrollkollektiv Akutversterben zeigte sich eine signifikante Reduktion MAP2-exprimierender Nervenzellen im Hypoxiekollektiv, sowohl im Ammonshorn als auch in der frontalen Großhirnrinde.

Trotz extrem kurzer Agonie und fehlender Reperfusion bzw. Reoxygenierung reicht der Sauerstoffmangel offenbar aus, um sichtbare Veränderungen mittels

MAP2-Antikörperbindung zu ermöglichen. Dabei scheint eine wesentliche Überlebenszeit nicht zwingend erforderlich zu sein.

Allerdings muss angemerkt werden, dass die genannten quantitativen Unterschiede von MAP2 nur bei Vergleich von Mittelwerten der Kollektive gewährleistet sind. Bei der Betrachtung des Einzelfalles kann nicht mit Sicherheit auf einen Tod durch Sauerstoffmangel geschlossen werden, da es auch in dieser Untersuchung Ausreißer gab, die bei alleiniger Betrachtung keine Zuordnung zum Hypoxiekollektiv ergeben hätten. Bei zusätzlichen Anhaltspunkten auf einen Erstickungstod kann die Untersuchung auf MAP2-Expression aber durchaus ergänzende Hinweise liefern.

Die eingangs gestellte Frage (Kapitel 2) nach signifikanten Unterschieden in der Expression von MAP2 in Nervenzellen an forensischem Material bei Tod durch Ersticken und Tod durch Akutversterben kann demnach bejaht werden, ebenso die Frage, ob MAP2 als früher Hypoxiemarker geeignet ist. Nur bezüglich der Sensitivität und Spezifität dieses Markers ist eine sichere Bestätigung nicht möglich.

5.2 Vergleich einzelner Erstickungskollektive

5.2.1 Vergleich der Erstickungskollektive mit dem Kontrollkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden je nach Ursache der hypoxischen/ischämischen Schädigung Kollektive gebildet, die verschiedene Mechanismen der Sauerstoffmangelschädigung repräsentieren. So stellt Erhängen das Korrelat einer Ischämie dar, Ertrinken eine hypoxisch-asphyktische Schädigung ohne Ischämie und die CO-Intoxikation weist neben der hypoxischen zusätzlich eine zytotoxische Komponente auf.

In der **Großhirnrinde** konnte in allen drei Erstickungskollektiven ein signifikant geringerer Anteil MAP2-exprimierender Neurone als im Kontrollkollektiv beobachtet werden. Dieses Ergebnis widerspricht einigen Autoren, die eine Ischämie als zwingende Voraussetzung für früh nachweisbare selektive Nervenzellverände-

rungen ansehen, bedingt durch einen Mangel an Sauerstoff und Substraten sowie fehlende Beseitigung von metabolischen Endprodukten. Eine reine Hypoxie, also ein alleiniger Sauerstoffmangel ohne Gefäßverschluß, sei nicht in der Lage, deutlich sichtbare selektive Zellschäden zu bewirken [4, 39, 53, 62]. Demnach hätte bei dem Vergleich der einzelnen Erstickungskollektive mit dem Kontrollkollektiv einzig das ischämische Kollektiv Erhängen einen signifikanten Verlust MAP2-positiver Neurone in vulnerablen Regionen aufweisen dürfen. Doch die hier beschriebenen signifikanten Veränderungen zeigten sich ebenfalls bei dem hypoxisch-asphyktischem Kollektiv Ertrinken. Diese hypoxisch bedingten Veränderungen der MAP2-Expression werden von Autoren gestützt, die durch Modifikation verschiedener Einflussgrößen nachwiesen, dass bereits Sauerstoffmangel im Sinne einer reinen Hypoxie einen Reaktionsverlust von MAP2 in Neuronen bewirken könne [34, 75]. Da in nahezu allen Tierversuchen zur MAP2-Expression als Modell eine Ischämie mittels Carotisligatur gewählt wurde, mangelt es an vergleichbaren Daten bezüglich hypoxischer Schädigung ohne Ischämie.

In der untersuchten **Ammonshornregion** waren signifikante MAP2-Verluste nur bei den Kollektiven Erhängen und CO-Intoxikation nachweisbar. Warum sich ein Tod durch Ertrinken in dieser Region anders verhält, ist unklar. Möglicherweise stellt in diesen Fällen kaltes Wasser durch die neuroprotektive Wirkung von Hypothermie einen gewissen Schutz dar. Dieser Mechanismus wird durch eine Hemmung der Proteinkinase C erklärt, die dadurch nicht an Glutamatrezeptoren binden und diese aktivieren kann, so dass die hypoxisch-ischämische Kaskade der Zellschädigung blockiert wird [63]. Auch werden postmortale Verluste der MAP2-Immunreaktivität durch Hypothermie verringert [33]. Zum anderen kann man die bereits oben diskutierte Erklärung heranziehen, dass eine Hypoxie ohne Ischämie, wie es beim Ertrinken der Fall ist, keine sichtbaren MAP2-Veränderungen auslösen soll. Dann bleibt dennoch unklar, warum ein Schutz des MAP2-Abbaus beim Ertrinken nur in der Ammonshornregion und nicht in der Großhirnrinde auftreten sollte.

5.2.2 Vergleich der Erstickungskollektive untereinander

Die Gruppe **CO-Intoxikation** zeigte im Vergleich zu den anderen beiden Erstickungskollektiven Erhängen und Ertrinken den stärksten Verlust MAP2-ex-

primierender Nervenzellen. Diese Reduktion könnte darin begründet liegen, dass neben der hypoxischen Wirkung von Kohlenmonoxid auch noch eine zytotoxische Komponente auf die Zellen einwirkt [4, 48].

Da Kohlenmonoxid den Elektronentransport in den Mitochondrien hemmt, fallen vermehrt schädigende Nebenprodukte an, so genannte PROS (partially reduced oxygen species). Sie oxidieren Lipide, Proteine und Nukleinsäuren und wirken somit direkt zytotoxisch. Obwohl dieser „oxidative Stress“ in der Reoxygenierungsphase verstärkt auftreten soll, wurde er auch während der CO-Intoxikation selbst nachgewiesen [77] und bietet damit eine Möglichkeit, den oben erwähnten verstärkten MAP2-Verlust zu erklären.

Zwischen den Kollektiven **Erhängen** und **Ertrinken** zeigte sich in der Ammonshornregion keine signifikant unterschiedliche MAP2-Expression. In allen untersuchten Schichten der Großhirnrinde waren dagegen mehr MAP2-positive Nervenzellen im Kollektiv Erhängen als im Kollektiv Ertrinken nachzuweisen.

Dieser Befund widerspricht der oben genannten These, eine Ischämie (Erhängen) bewirke eine stärkere Schädigung der vulnerablen Hirnregionen als eine hypoxische nicht-ischämische Einwirkung (Ertrinken). Dieser Widerspruch kann nicht klar begründet werden. Eventuell stellt das Ertrinken durch mehrfaches Auftauchen und Luftschnappen einen protrahierten Erstickungsvorgang dar, der sich durch vermehrten MAP2-Rückgang darstellt. Theoretisch können zusätzlich andere Mechanismen eine Rolle spielen wie Unterschiede im Ausmaß der Azidose, Blutdruckabfall oder Differenzen in der Katecholaminausschüttung.

Die Frage, ob einzelne Erstickungskollektive je nach Todesursache durch MAP2 sicher diskriminiert werden können, muss verneint werden. Obwohl Tendenzen sichtbar werden und Unterschiede zum Teil statistisch signifikant nachweisbar sind, lässt sich bei Betrachtung von einzelnen Todesfällen keine eindeutige Zuordnung vornehmen. Auffällig ist allerdings die sehr geringe MAP2-Expression in Nervenzellen des Kollektivs CO-Intoxikation, die bei Betrachtung der Gruppenmittelwerte eine deutliche Unterscheidung gegenüber den übrigen Kollektiven erlaubt. Diese Tatsache könnte in der forensischen Diagnostik eine nützliche Hilfe bei der Diagnosesicherung einer Kohlenmonoxidvergiftung darstellen.

5.3 Vulnerabilität einzelner Regionen

5.3.1 Vulnerabilität der Ammonshornregion

Das Ammonshorn wird seit langem als eines der Hirnareale angesehen, das gegenüber Sauerstoffmangel besonders empfindlich ist. Besonders die **CA1-Region**, der so genannte Sommer-Sektor, ist als extrem sensitiver Bereich bekannt [7, 31, 43, 47, 53, 63, 74]. Sichtbare Zelluntergänge treten hier allerdings erst nach einer Überlebenszeit von 2–3 Tagen auf, was den Begriff „delayed neuronal death“ (verzögerter neuronaler Tod) prägte [30]. Wurde diese erhöhte Vulnerabilität früher mit vaskulären Ursachen oder physiko-chemischen Eigenschaften der Nervenzellen begründet, liegt die heute weitgehend anerkannte Erklärung in einer besonders hohen Konzentration an Glutamat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) der Neurone in dieser Region [3, 63, 74]. Die exzitotoxische Kaskade ischämischer Nervenzellschädigung kommt somit in diesem Bereich vermehrt zur Auswirkung (siehe Kapitel 1.5.2).

Allerdings: Ein signifikanter Verlust MAP2-positiver Nervenzellen in der Region CA1 konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, war aber auch nicht zu erwarten, da die notwendige Überlebenszeit für sichtbare Veränderungen in den Kollektiven 1–4 nicht gegeben war. In Tierversuchen wurde im Sektor CA1 der größte Verlust an MAP2-exprimierenden Nervenzellen beobachtet, allerdings wiederum nur nach Reperfusion und einem Überlebensintervall von einigen Tagen, welches bei fast allen Tierversuchen standardisiert vorhanden war [7, 32, 34, 65, 76].

Andererseits wurde in der eigenen Untersuchung der größte Verlust MAP2--positiver Nervenzellen in der **Region CA4** des Ammonshorns beobachtet. Dieser Befund wird durch die Literatur gestützt [3, 19, 31, 65]: Schwere Ischämie bewirkt danach eine frühe Nervenzellschädigung, die vornehmlich in der Hilusregion CA4 des Ammonshorns sichtbar wird; leichte Ischämie wird dagegen erst als verzögerte Schädigung besonders in der CA1-Region sichtbar, was auch als „maturation phenomenon“, also Reifungsphänomen, bezeichnet wird [24, 30]. Eine schwere Schädigung ist in den untersuchten Erstickungskollektiven gewährleistet, eine schnelle Reaktion wird beobachtet: der früh detektierbare MAP2-Verlust in der Region CA4 am Menschen deckt sich also mit den Ergebnissen der Tierversuche.

Die **Region CA2**, die neben der Region CA4 ebenfalls früh auf Sauerstoffmangel reagieren soll [31, 32, 65, 76], zeigte in den eigenen Untersuchungen keine signifikant geringere MAP2-Expression als die übrigen Ammonshornsegmente. Eine relative Stabilität der **CA3-Region** gegenüber Sauerstoffmangel konnte demgegenüber bestätigt werden [31, 65].

Beim Vergleich **Großhirnrinde versus Ammonshorn** zeigte sich ein stärkerer MAP2-Expressionsverlust in der Ammonshornregion, möglicherweise bedingt durch eine höhere Sauerstoffempfindlichkeit dieser Region. Eine früher nachweisbare Vulnerabilität des Hippokampus gegenüber der Hirnrinde wurde auch in anderen Studien beobachtet [7, 76]. Möglicherweise liegt auch hier die Begründung in einem unterschiedlich dichten Besatz der Nervenzellen mit NMDA-Rezeptoren. Außerdem scheint die relativ kurze Agoniephase bei Fällen eines Erstickungstodes dennoch auszureichen, um Unterschiede in der Intensität der Sauerstoffmangelschädigung in den untersuchten Regionen zu erzeugen.

5.3.2 Vulnerabilität der Großhirnrinde

Die Großhirnrinde zählt zu den hypoxisch vulnerablen Arealen des Gehirns [43, 47, 52]. Insbesondere das in dieser Studie gewählte Areal zwischen erster und zweiter Frontalhirnwindung ist durch die Versorgung von Endarterien der Arteria cerebri anterior und Arteria cerebri media in ihrer Sauerstoffversorgung gefährdet, was durch das Auftreten so genannter Wasserscheideninfarkte zum Ausdruck kommt [43, 67] (siehe Kapitel 3.2.2).
Bei der Untersuchung der frontalen Großhirnrinde erwiesen sich die **Rindenschichten III, IV und V** durch deutlichen MAP2-Verlust vulnerabler als die **Schichten II und VI**, die sich gegenüber Sauerstoffmangel relativ stabil zeigten. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen vieler Tierversuche, in denen die relative Stabilität der Schichten II und VI sowie die Instabilität der Schichten III–V bestätigt wird [3, 32, 63, 65, 76]. Der Grund der selektiven Vulnerabilität einzelner Nervenzellschichten ist nicht sicher geklärt, könnte aber in einem vermehrten Vorkommen von NMDA-Rezeptoren in diesen Gebieten – wie schon in der CA1-Region des Ammonshorns dargestellt – begründet liegen.

5.4 Beziehung zwischen MAP2-Expression und Überlebenszeit

In fast sämtlichen Tierversuchen bezüglich MAP2-Expression und Sauerstoffmangel überleben die Tiere nach Auslösen einer Ischämie eine definierte Zeit. Durch die erfolgte Reperfusion soll der verursachte Schaden verstärkt bzw. überhaupt erst sichtbar werden, wie schon beim oben erwähnten „verzögerten neuronalen Tod“ der CA1-Region erwähnt (siehe Kapitel 5.1.1 und 5.3.1). Mit fortschreitender Überlebenszeit zeigte sich dabei eine zunehmende Nervenzellschädigung [17, 66, 73, 76], auch in einer der wenigen Studien an menschlichem Hirngewebe [2].

Allerdings sprechen Ota et al. [47] auch von einer Erholung der Neurone, sobald eine gewisse Zeitspanne überschritten wird: So war in ihrer Studie die MAP2-Expression nach einem Überlebenszeitintervall von 24 h maximal vermindert, nach 72 h jedoch wieder deutlich erhöht. Dies könnte aber neben der genannten Erholung auch in einem Untergang der geschädigten Nervenzellen begründet sein, so dass sich nur das Verhältnis wieder normalisiert und die geschädigten Zellen nicht mehr in die Auszählung einbezogen werden können. Hier müsste die absolute Anzahl der Neurone bestimmt werden.

Das Kollektiv 5, also kurzzeitig überlebte Hypoxie/Ischämie, konnte wegen mangelnder Fallzahl nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen werden (siehe Kapitel 4.2.5). Die oben genannte Tendenz einer vermehrten Nervenzellschädigung wurde als verminderte MAP2-Expression in diesem Kollektiv ebenfalls beobachtet. Eine Abhängigkeit von der Überlebenszeit war nicht erkennbar und ein geeigneter Studienaufbau ist wegen unregelmäßiger Verteilung der Überlebensintervalle vermutlich auch in Zukunft schwer realisierbar, da man die ideale Staffelung wie in Tierversuchen natürlich nie erreicht. Ferner besteht auch für diese Untersuchung das Problem des Nervenzellverlustes, so dass mit der Relativzahl (MAP2-exprimierende versus MAP2-negative Neurone) keine Aussage möglich ist.

5.5 Qualitative Diskussion des Expressionsverlustes von MAP2

In der vorliegenden Studie wurde bei fehlendem Farbniederschlag zur Vereinfachung stets von einem MAP2-Expressionsverlust gesprochen. Der Anfärbbarkeitsverlust weist allerdings nur auf eine verloren gegangene Immunreaktivität hin. Er unterscheidet nicht, ob immunnegative Zellen irreversibel geschädigt sind, ob nur ein Antigenverlust bei weiterhin bestehender Vitalität der Zellen vorliegt oder ob andere subtile Veränderungen stattfinden, die das Antigen der Färbung unzugänglich machen [37]. Ursächlich für einen nur vorübergehenden Anfärbbarkeitsverlust könnte die Phosphorylierung von MAP2 oder ein pH-Wechsel im Gewebe sein, die einen zeitweiligen Verlust der Antigenität erklären würden [47].

Ob solch eine reversible Zellveränderung als Ursache für den beobachteten MAP2-Anfärbbarkeitsverlust in dieser Studie vorlag, kann nur spekuliert werden. Eine Reversibilität der Veränderung erscheint allerdings wahrscheinlicher als eine irreversible Schädigung des Zytoskeletts mit permanentem MAP2-Verlust, da hierfür eine gewisse Überlebenszeit vorausgesetzt wird [28], die in der überwiegenden Zahl der Fälle in dieser Studie nicht gegeben war. Zudem wiesen Untersuchungen reversible Antigenmaskierungen von MAP2 nach: Bei erneuter Reperfusion zeigten die Nervenzellen eine Wiederherstellung der Immunreaktivität bis 24 h [22] bzw. bis 72 h [47] nach hypoxisch-ischämischer Schädigung. Der Grund dieser erneuten posttraumatischen Antigenitätserhöhung ist unklar. Eine Reorganisation des Proteins im Neuron oder eine verstärkte Proteinsynthese wären denkbar.

Ob darüber hinaus diffuse Zelluntergänge stattfanden, ist mit der gewählten Untersuchungsmethode nicht zu bestimmen: es wurde lediglich das relative Verhältnis zwischen reagierenden und nicht-reagierenden Zellen bestimmt. Zur Ermittlung einer absoluten Nervenzellreduktion wäre der computergestützte Vergleich zu Normalpopulationen erforderlich. Doch unabhängig davon, ob die beobachteten Veränderungen nur frühe reversible Zellveränderungen widerspiegeln oder den kompletten Zelltod, kann ihr Auftreten dabei helfen, die Pathophysiologie bei zerebraler Ischämie besser zu verstehen.

5.6 Kritik der Methodik

Da es sich in dieser Studie um **menschliches Untersuchungsgut** handelt, sind anders als in standardisierten Tierversuchen einige Kriterien nicht klar erfassbar. Die Dauer der Sauerstoffmangelschädigung, die Länge der Agonie und damit die Überlebenszeit können zwar gründlich recherchiert, aber nur selten objektiviert werden. Diese Kritikpunkte werden sich bei Untersuchungen an forensischem Material nie endgültig vermeiden lassen. Dennoch kann nicht grundsätzlich auf Tierversuche ausgewichen werden, da eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen am Ende gewährleistet sein muss.

Einflussfaktoren, die eine hypoxische Nervenschädigung vortäuschen können, wie Epilepsie, hohes Alter oder Veränderungen beim Diabetes mellitus wurden bei der Fallauswahl berücksichtigt (siehe Kapitel 3.1.1). Es ist jedoch möglich, dass es weitere Faktoren gibt, deren Einfluss bisher nicht bekannt wurde, die aber als Fehlerquelle einwirken. So wird in einigen Studien ein MAP2-Verlust durch Neurotoxine wie Aluminium, durch Krankheiten wie Schizophrenie oder durch langjährige Drogenabhängigkeit vermutet [26, 45]. Weitere Einflussfaktoren könnten zukünftig entdeckt bzw. bestätigt werden und in nachfolgenden Studien Berücksichtigung finden.

Postmortale Bewertungen hypoxischer Veränderungen zytoskelettaler Proteine am menschlichen Gewebe bedürfen einiger Vorsicht, da mit fortschreitendem postmortalen Intervall auch eine Degeneration dieser Proteine festgestellt wurde [23, 57]. Allerdings geschah dies erst ab einer Liegezeit von etwa 48 h. Bis 24 h post mortem erwies sich das Epitop MAP2 als stabil [68]. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen postmortalem Intervall und MAP2-Expression. Die Leichenliegezeit in dieser Untersuchung betrug durchschnittlich 24 h, der Großteil der Fälle war also vermutlich nicht von den Veränderungen betroffen; in Einzelfällen wäre eine derartige Verfälschung jedoch zu erörtern.

Ein weiterer möglicher Kritikpunkt ist die **Formalinfixierung**, die lange Zeit durch ihre Fähigkeit der Maskierung von Epitopen als verfälschend galt, so dass eine Fixierungsdauer von maximal 24 h gefordert worden ist [42, 68]. Eine der-

artig kurze Einwirkzeit ist bei der forensischen Fixierung nicht möglich, da das Gehirn für eine korrekte neuropathologische Befunderhebung im Ganzen fixiert werden muss und das Formalin innerhalb von 24 h nur wenige Millimeter tief ins Gewebe eindringen würde.

Seit der Anwendung der „antigen retrieval"-Methode von Shi et al. [59], also der Demaskierung von Antigenen durch Erhitzung in der Mikrowelle, werden sehr gute Ergebnisse auch nach langer Fixierungsdauer beobachtet. Besonders durch Verwendung von Zitratpuffer oder Urealösung ließ sich die ursprüngliche Antigenität vieler Proteine auch noch nach einigen Monaten Formalinfixierung wiederherstellen [59, 60, 61, 64]. Da in dieser Studie ebenfalls die Mikrowellenbehandlung mit Citratpuffer angewendet wurde (siehe Kapitel 3.1.5), ist diese Fehlerquelle als eher gering einzuschätzen, zumal sie alle Fälle gleichermaßen betrifft.

Als weitere Fehlerquelle könnte das Auszählen der Neurone angesehen werden, da es eine **subjektive Bewertung** darstellt, die auf der Entscheidung „reaktiv/ nicht-reaktiv" beruht. Wie bei jeder Wertung lassen sich Fehler nicht ausschließen. Ein standardisiertes Zählverfahren ist in der Immunhistochemie allerdings schwierig, da computergestützte Methoden die vielen Einflüsse auf das Färbeverhalten nur ungenügend berücksichtigen können. Mit der Weiterentwicklung dieser Verfahren lassen sich vielleicht in Zukunft Daten gewinnen, die die Objektivität eines Computers und die Erfahrung eines Menschen vereinen.

5.7 Ausblick für die weitere Forschung

Die Ergebnisse dieser Studie mussten größtenteils mit Resultaten aus Tierversuchen verglichen werden, da nur wenige Untersuchungen bezüglich des MAP2-Verhaltens bei Sauerstoffmangel an menschlichem Gewebe vorliegen. Zwar wirken in Tierversuchen weniger Störgrößen auf die gewonnenen Ergebnisse ein, von einer vollständigen Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgegangen werden. Es wäre demnach zweckmäßig, bei der Suche nach einem Hypoxiemarker in Zukunft auch verstärkt forensisches Material zu nutzen.

Für die Weiterführung dieser Studie erscheint es sinnvoll, auch jene zwei Gruppen in ausreichender Anzahl mit einzubeziehen, die aufgrund mangelnder Fallzahl

nicht ausgewertet werden konnten. Dabei handelt es sich zum einen um die Todesursache Erwürgen/Erdrosseln, die interessante Ergebnisse erwarten lässt, da sie aufgrund intermittierender Reperfusion einen anderen Mechanismus als die übrigen aufgeführten Todesursachen aufweist. Zum anderen ließe sich bei größerer Fallzahl einer überlebten Hypoxie/Ischämie eine grobe Staffelung nach Überlebenszeit aufstellen – zwar nicht in so idealer Weise wie im Tierversuch, aber dennoch ausreichend, um etwaige zeitabhängige Nervenzellveränderungen zu erfassen.

Weiterhin erscheint es angebracht, sich nicht nur – wie gehäuft in Tierversuchen praktiziert – auf die Erforschung ischämisch bedingter Schäden zu beschränken. Wie in dieser Untersuchung vermutet, verdienen auch hypoxische oder zytotoxische Schädigungsmechanismen Aufmerksamkeit, da sie ebenfalls als frühe Nervenzellveränderungen nachweisbar und in der forensischen Praxis gehäuft anzutreffen sind.

Im Rahmen der Erforschung von MAP2 wurden in letzter Zeit immer mehr Zusammenhänge herausgefunden, beispielsweise mit Krankheitsbildern wie Lupus erythematodes [72], plötzlichem Kindstod [55] oder Schizophrenie [35]. Diese neuen Erkenntnisse tragen dazu bei, die Wirkungsweise von MAP2 besser zu verstehen und in zukünftigen Untersuchungen zu nutzen.

Trotz der frühen Sensitivität von MAP2 sollte auch in Zukunft nach weiteren Hypoxiemarkern gesucht werden, die eine Verbesserung in Sensitivität, Spezifität und frühem Reaktionsverhalten liefern. So zeigte sich SMI-32, ein Antikörper gegen nicht-phosphorylierte Neurofilamente, im Versuch an forensischem Material als äußerst sensitiv gegenüber Ischämie [37]. Noch fehlen bestätigende Untersuchungen dieses Markers, wären aber in Anbetracht der sehr guten Ergebnisse durchaus wünschenswert.

Zur Bestätigung oder auch Widerlegung der vorliegenden Ergebnisse wären weitere Studien an forensischem Material hilfreich, eventuell an noch größeren Kollektiven und mit computergestützten Zählverfahren. So könnte sich die Hoffnung auf Entdeckung eines geeigneten Hypoxiemarkers in der forensischen Medizin in naher Zukunft erfüllen.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Der Tod durch Ersticken repräsentiert einen beträchtlichen Anteil am forensischen Obduktionsgut – sein Nachweis gestaltet sich allerdings schwierig. Aus Mangel an histomorphologischen oder biochemischen Markern muss häufig auf unspezifische und unsichere Nachweismethoden zurückgegriffen werden.
Da in Tierversuchen der Zytoskelettbaustein Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) in hypoxisch/ischämisch geschädigten Nervenzellen vermindert nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob auch in humanem Gewebe ein akuter Erstickungstod durch verminderte Anzahl MAP2-exprimierender Nervenzellen spezifisch nachweisbar wäre.

Ein Erstickungskollektiv, bestehend aus Todesfällen infolge von *Erhängen* (n=19), *Ertrinken* (n=14) und *Kohlenmonoxid(CO)-Intoxikation* (n=12) wurde einem Kontrollkollektiv *Akutversterben* (n=27) gegenübergestellt. Der prozentuale Anteil immunreaktiver (MAP2-positiver) Nervenzellen wurde in jedem der Segmente CA1–CA4 der Ammonshornregion und in jeder der Schichten II–VI der frontalen Großhirnrinde nach Auszählen von je 100 Nervenzellen ermittelt.

Im Vergleich zum Kontrollkollektiv zeigte das Gesamtkollektiv *Ersticken* eine signifikant geringere MAP2-Expression in den Regionen CA2-CA4 ($p<0{,}05$) sowie in allen untersuchten Kortexschichten ($p<0{,}001$). Den stärksten Rückgang immunreaktiver Neurone – und damit die größte Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel – wiesen dabei die Schichten III–V sowie die Region CA4 auf. Bei Aufschlüsselung des Erstickungskollektivs zeigte das Kollektiv *CO-Intoxikation* tendenziell den größten Verlust MAP2-positiver Nervenzellen. Eine sichere Diskriminierung der Kollektive untereinander war allerdings nicht möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass MAP2 durchaus geeignet ist, eine akute hypoxische/ischämische Schädigung an humanem Hirngewebe nachzuweisen und die forensische Diagnostik zu unterstützen, wenn auch die Anforderungen an einen verlässlichen Hypoxiemarker nicht ausreichend erfüllt sind.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflage
bzw.	beziehungsweise
ca. / ∼	circa
d.h.	das heißt
lfd.	laufend(e)
m	männlich
n	Anzahl
Nr.	Nummer
u.a.	unter anderem/n
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

Verwendete Einheiten

°C	Grad Celsius
μm	Mikrometer
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
sec	Sekunde(n)

Wissenschaftliche Abkürzungen

AEC	Aminoethylcarbazol
AH	Ammonshorn
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Cornu ammonis
Ca^{++}	Calcium
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
COHb	Carboxyhämoglobin
H^+	Wasserstoff
H_2O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSP	Hitzeschockprotein(e)
K^+	Kalium
LSAB	Labelled Streptavidin
	Biotin
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes
	Protein
Na^+	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NZ	Nervenzelle(n)
O_2	Sauerstoff
S	Sektionsnummer
ÜZ	Überlebenszeit

Literaturverzeichnis

[1] Abe K: Stress protein inductions in cerebral ischemia. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 115–129, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[2] Akulinin VA, Dahlstrom A: Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. Neurochem Res 28, 373–378 (2003)

[3] Auer RN, Siesjö BK: Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy. Ann Neurol 24, 699–707 (1988)

[4] Auer RN: Pure hypoxic and ischemic brain insults. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 27–39, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[5] Berg S, Bonte R: Catecholaminwerte im Leichenblut und –liquor bei verschiedenen Agonieformen. Z Rechtsmed 72, 56–62 (1973)

[6] Berg SP: Grundriß der Rechtsmedizin. 12. Aufl., 204–217 und 247–267, Müller & Steinicke, München, 1984

[7] Bernaudin M, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E: Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. Exp Neurol 150, 30–39 (1998)

[8] Bernhardt R, Matus A: Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. J Comp Neurol 226, 203–221 (1984)

[9] Boenisch T (Hrsg.): Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Aufl., DakoCytomation Corp., Carpinteria/USA, 2003

[10] Bourne JA: Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden. DakoCorporation, Carpinteria/USA, 1983

[11] Brettel HF: Ersticken infolge Strangulation. In: Forster B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. 124–137, Thieme, Stuttgart, 1986

[12] Brinkmann B: Fehlleistungen bei der Leichenschau in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse einer multizentrischen Studie (II). Arch Kriminol 199, 65–74 (1997)

[13] Bühl A, Zöfel P: SPSS 11, Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 8. Aufl., Pearson Studium, München, 2002

[14] Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robbins pathologic basis of disease. 6. Aufl., 7–13, W.B. Saunders Company, Philadelphia/USA, 1999

[15] Cross HS, Peterlik M: Zellmembran und Zellkern. In: Wick G, Schwarz S, Förster O, Peterlik M (Hrsg.): Funktionelle Pathologie. Molekulare, zelluläre, systemische Grundlagen. 2. Aufl., 3–25, Fischer, Stuttgart, 1989

[16] Denk H, Zatloukal K: Adaptation, Zellschädigung, Zelltod. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie. 2. Aufl., 50–66, Urban & Fischer, München, 2001

[17] Geddes JW, Schwab C, Craddock S, Wilson JL, Pettigrew LC: Alterations in τ immunostaining in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 14, 554–564 (1994)

[18] Gibson GE, Peterson C: Calcium and the aging nervous system. Neurobiol Aging 8, 329–343 (1987)

[19] Grady MS, Charleston JS, Maris D, Witgen BM, Lifshitz J: Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. J Neurotrauma 20, 929–941 (2003)

[20] Hirokawa N: Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. Curr Opin Cell Biol 6, 74–81 (1994)

[21] Hossmann KA: Pathophysiology of brain resuscitation after cardiac arrest. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 145–164, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[22] Huh JW, Raghupathi R, Laurer HL, Helfaer MA, Saatman KE: Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. J Neurotrauma 20, 975–984 (2003)

[23] Irving EA, McCulloch J, Dewar D: The effect of postmortem delay on the distribution of microtubule-associated proteins τ, MAP2, and MAP5 in the rat. Mol Chem Neuropathol 30, 253–271 (1997)

[24] Ito U, Spatz M, Walker JT Jr, Klatzo I: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. Acta Neuropathol (Berl) 32, 209–223 (1975)

[25] Jenkins LW, Povlishock JT, Lewelt W, Miller JD, Becker DP: The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. Acta Neuropathol (Berl) 55, 205–220 (1981)

[26] Johnson GVW, Jope RS: The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. J Neurosci Res 33, 505–512 (1992)

[27] Kalcheva N, Albala JS, Binder LI, Shafit-Zagardo B: Localization of specific epitopes on human microtubule-associated protein 2. J Neurochem 63, 2336–2341 (1994)

[28] Kalimo H, Olsson Y, Paljärvi L, Söderfeldt B: Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. J Cereb Blood Flow Metab 2, 19–22 (1982)

[29] Keil W: Tod im Wasser. In: Madea B (Hrsg.): Praxis Rechtsmedizin. Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung. 166–170, Springer, Berlin, 2003

[30] Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239, 57–69 (1982)

[31] Kirino T, Sano K: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. Acta Neuropathol (Berl) 62, 201–208 (1984)

[32] Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T: Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage – immunohistochemical investigation of dendritic damage. Neuroscience 31, 401–411 (1989)

[33] Kitamura O, Gotohda T, Ishigami A, Tokunaga I, Kubo S, Nakasono I: Effect of hypothermia on postmortem alterations in MAP2 immunostaining in the human hippocampus. Leg Med (Tokyo) 7, 24–30 (2005)

[34] Kwei S, Jiang C, Haddad GG: Acute anoxia-induced alterations in MAP2 immunoreactivity and neuronal morphology in rat hippocampus. Brain Res 620, 203–210 (1993)

[35] Law AJ, Hutchinson LJ, Burnet PWJ, Harrison PJ: Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex. J Neurosci Res 76, 376–382 (2004)

[36] Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW: Brain tissue responses to ischemia. J Clin Invest 106, 723–731 (2000)

[37] Leifer D, Kowall NW: Immunohistochemical patterns of selective cellular vulnerability in human cerebral ischemia. J Neurol Sci 119, 217–228 (1993)

[38] Logemann E, Werp J: Gifte und Schadstoffe. In: Forster B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. 683–706, Thieme, Stuttgart, 1986

[39] Malinak C, Silverstein FS: Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. Biol Neonate 69, 257–267 (1996)

[40] Maxeiner H: Gewaltsame Erstickung. In: Madea B (Hrsg): Praxis Rechtsmedizin. Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung. 147–166, Springer, Berlin, 2003

[41] Mitani A, Andou Y, Kataoka K: Selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons cannot be explained in terms of an increase in glutamate concentra-

tion during ischemia in the gerbil: brain microdialysis study. Neuroscience 48, 307–313 (1992), Erratum in: Neuroscience 50, 251 (1992)

[42] Naish SJ (Hrsg.), Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. DakoCorporation, Carpinteria/USA, 1989

[43] Oehmichen M: Neuropathologie der forensisch relevanten Formen des Erstickens. In: Brinkmann B, Püschel K (Hrsg.): Ersticken. Fortschritte in der Beweisführung. 151–157, Springer, Berlin, 1990

[44] Oehmichen M, Meissner C: Forensic neuropathological aspects of cerebral anoxia/ischemia and hypoxia/hypoxemia. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 13–25, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[45] Oehmichen M, Meissner C, von Wurmb-Schwark N, Schwark T: Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. Leg Med 5, 190–201 (2003)

[46] Olney JW: Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. J Neuropathol Exp Neurol 30, 75–90 (1971)

[47] Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K: Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. Am J Obstet Gynecol 177, 519–526 (1997)

[48] Piantadosi CA, Zhang J, Demchenko IT: Production of hydroxyl radical in the hippocampus after CO hypoxia or hypoxic hypoxia in the rat. Free Radic Biol Med 22, 725–732 (1997)

[49] Qi JP, Wu AP, Wang DS, Wang LF, Li SX, Xu FL: Correlation between neuronal injury and Caspase-3 after focal ischemia in human hippocampus. Chin Med J (Engl) 117, 1507–1512 (2004)

[50] Rami A, Krieglstein J: Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. Brain Res 609, 67–70 (1993)

[51] Reinhardt G, Mattern R: Erhängen, Erdrosseln, Erwürgen, Ertrinken. In: Bob A, Bob K (Hrsg.): Ökologisches Stoffgebiet. 3. Aufl., 390–408, Hippokrates, Stuttgart, 1999

[52] Riede UN: Anorganische Stoffe. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl., 78–87, Thieme, Stuttgart, 1999

[53] Roggendorf W: Kreislaufstörungen des ZNS. In: Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.): Neuropathologie. Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur. 3. Aufl., 113–166, Springer, Berlin, 2002

[54] Sachs L: Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden. 8. Aufl., Springer, Berlin, 1997

[55] Sawaguchi T, Franco P, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Nishida H, Kahn A: The correlation between microtubule-associated protein 2 in the brainstem of SIDS victims and physiological data on sleep apnea. Pathophysiology 10, 203–209 (2004)

[56] Schulz E: Der Tod durch Ersticken. In: Forster B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. 121–124, Thieme, Stuttgart, 1986

[57] Schwab C, Bondada V, Sparks DL, Cahan LD, Geddes JW: Postmortem changes in the levels and localization of microtubule-associated proteins (tau, MAP2 and MAP1B) in the rat and human hippocampus. Hippocampus 4, 210–225 (1994)

[58] Schwerd W (Hrsg.): Rechtsmedizin. 4. Aufl., 67–79 und 174–177, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1986

[59] Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39, 741–748 (1991)

[60] Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemi-

cal demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. J Histochem Cytochem 41, 1599–1604 (1993)

[61] Shi SR, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval techniques: current perspectives. J Histochem Cytochem 49, 931–937 (2001)

[62] Simon RP: Hypoxia versus ischemia. Neurology 52, 7–8 (1999)

[63] Smith ML: Injury-determining factors and cellular mechanisms for ischemic damage in the brain. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 59–64, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[64] Suurmeijer AJH, Boon ME: Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections. Eur J Morphol 31, 144–150 (1993)

[65] Tomimoto H, Yanagihara T: Vulnerability of dendrites and nerve cell bodies in cerebral ischemia. In: Oehmichen M (Hrsg.): Brain hypoxia and ischemia. Research in legal medicine. Vol. 24, 65–84, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000

[66] Tomioka C, Nishioka K, Kogure K: Absence of early destructive changes of cytoskeletal proteins after transient ischemia in the rat. Brain Res 586, 352–357 (1992)

[67] Torvik A: The pathogenesis of watershed infarcts in the brain. Stroke 15, 221–223 (1984)

[68] Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VMY: Distribution of phosphate-independent MAP2 epitopes revealed with monoclonal antibodies in microwave-denatured human nervous system tissues. J Neurosci Methods 29, 171–180 (1989)

[69] Tucker RP: The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. Brain Res Brain Res Rev 15, 101–120 (1990)

[70] Vanicky I, Balchen T, Diemer NH: Alterations in MAP2 immunostainability after prolonged complete brain ischaemia in the rat. Neuroreport 7, 161–164 (1995)

[71] West MJ: Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. Neurobiol Aging 14, 287–293 (1993)

[72] Williams RC Jr, Sugiura K, Tan EM: Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 50, 1239–1247 (2004)

[73] Xia XY, Ikeda T, Ota A, Xia YX, Sameshima H, Ikenoue T, Toshimori K: Heat shock protein 72 expression and microtubule-associated protein 2 disappearance after hypoxia-ischemia in the developing rat brain. Am J Obstet Gynecol 180, 1254–1262 (1999)

[74] Yamamoto K, Morimoto K, Yanagihara T: Cerebral ischemia in the gerbil: transmission electron microscopic and immunoelectron microscopic investigation. Brain Res 384, 1–10 (1986)

[75] Yamaoka Y, Shimohama S, Kimura J, Fukunaga R, Taniguchi T: Neuronal damage in the rat hippocampus induced by in vivo hypoxia. Exp Toxicol Pathol 45, 205–209 (1993)

[76] Yanagihara T, Brengman JM, Mushynski WE: Differential vulnerability of microtubule components in cerebral ischemia. Acta Neuropathol (Berl) 80, 499–505 (1990)

[77] Zhang J, Piantadosi CA: Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. J Clin Invest 90, 1193–1199 (1992)

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schematische Darstellung der drei Hauptformen des Strangulationstodes 6
1.2 Darstellung der Signalkette bei zellulärer Schädigung durch Hypoxie/Ischämie 11

3.1 Die drei Schritte der LSAB-Methode 21
3.2 Schematische Darstellung der Regionen der Ammonshornformation 24
3.3 Schematische Darstellung der Rindenschichten des Neokortex . . . 26

4.1 Fotografische Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen der Großhirnrinde eines Kontrollfalls 31
4.2 Fotografische Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen der Ammonshornregionen zweier Hypoxiefälle 32
4.3 Fotografische Darstellung MAP2-negativer Nervenzellen in der Ammonshornregion eines Hypoxiefalls 33
4.4 Fotografische Darstellung von Sektorausfällen in der Ammonshornregion 34
4.5 Ammonshorn - Synopsis der MAP2-Expression des Kollektivs Ersticken 35
4.6 Großhirnrinde – Synopsis der MAP2-Expression des Kollektivs Ersticken 36
4.7 Ammonshorn – Synopsis der MAP2-Expression einzelner Erstickungskollektive 37
4.8 Großhirnrinde – Synopsis der MAP2-Expression einzelner Erstickungskollektive 38

Tabellenverzeichnis

A.1 Tabellarische Darstellung der Fälle eines Akutversterbens 65
A.2 Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch Erhängen . 66
A.3 Tabellarische Darstellung der Fälle einer kurzzeitig überlebten Hypoxie/Ischämie 66
A.4 Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch CO-Intoxikation 67
A.5 Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch Ertrinken . 67

B.1 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs CO-Intoxikation 68
B.2 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Akutversterben 69
B.3 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Ersticken 70
B.4 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Ertrinken 70
B.5 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Erhängen 71
B.6 Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Hypoxie/Ischämie mit Überlebenszeit 72
B.7 Statistische Signifikanz beim Vergleich der Kollektive Akutversterben und Ersticken 72
B.8 Statistische Signifikanz beim Vergleich des Kontrollkollektivs mit den Kollektiven Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation 73
B.9 Statistische Signifikanz beim Vergleich der Kollektive Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation untereinander 73
B.10 Statistische Signifikanz der untersuchten Regionen innerhalb der Kollektive Akutversterben, Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation 74

Anhang A

Aufschlüsselung der Kollektive

Lfd. Nr.	Sektions-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Ursache des akuten Verblutens
1	31/02	40	m	Zugunfall
2	4/02	43	m	Sturz aus großer Höhe
3	158/01	21	m	Zugunfall
4	9/01	33	m	Herzdurchschuss
5	95/00	23	w	Fallschirmabsturz
6	158/99	61	w	Zugunfall
7	166/98	43	m	LKW-Unfall
8	88/98	42	m	Stichverletzung
9	74/98	35	m	Sturz aus großer Höhe
10	178/97	45	m	Stichverletzung
11	170/97	46	w	PKW-Unfall
12	169/97	41	w	PKW-Unfall
13	165/97	54	w	Herzdurchschuss
14	116/97	31	m	Sturz aus großer Höhe
15	50/97	12	m	Halsdurchschuss
16	49/97	45	m	Sturz aus großer Höhe
17	3/97	47	m	Herzdurchschuss
18	142/96	50	m	Hubschrauberabsturz
19	140/96	42	m	Hubschrauberabsturz
20	138/96	46	m	Hubschrauberabsturz
21	75/96	18	m	Sturz aus großer Höhe
22	147/95	27	m	Motorradunfall
23	86/95	21	m	Herzdurchschuss
24	73/94	29	w	PKW-Unfall
25	15/94	54	w	Sturz aus großer Höhe
26	117/93	22	w	Sturz aus großer Höhe
27	212/92	27	m	Zugunfall

Tabelle A.1: Tabellarische Darstellung der Fälle eines Akutversterbens

Lfd. Nr.	**Sektions-Nr.**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**
1	11/02	30	w
2	10/02	37	m
3	195/01	32	m
4	119/01	46	m
5	113/01	36	m
6	66/01	31	m
7	183/99	40	m
8	178/99	36	m
9	143/99	46	m
10	135/99	45	m
11	13/99	31	m
12	182/98	41	m
13	107/98	38	m
14	63/98	51	m
15	32/98	59	m
16	44/97	35	m
17	31/97	38	w
18	30/97	35	m
19	114/96	26	m

Tabelle A.2: Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch Erhängen

Lfd.Nr.	**Sektions-Nr.**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**ÜZ (h)**	**Todesursache**
1	170/02	52	m	240	CO-Vergiftung
2	122/02	58	w	1	Ertrinken
3	16/02	62	m	42,5	CO-Vergiftung
4	52/00	48	m	504	CO-Vergiftung
5	GA 42/00	47	m	72	Erhängen
6	25/00	37	m	10	CO-Vergiftung
7	171/97	15	m	1	Ersticken bei Verschüttung
8	53/97	12	m	3	Ertrinken
9	11/93	9	w	19	Ertrinken

Tabelle A.3: Tabellarische Darstellung der Fälle einer kurzzeitig überlebten Hypoxie/Ischämie, ÜZ (h) = Überlebenszeit in Stunden, GA = Gutachten

Lfd. Nr.	Sektions-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	COHb
1	155/01	23	m	81
2	54/00	57	m	86
3	171/99	65	m	70
4	16/99	40	m	72
5	187/98	50	m	65
6	18/98	32	m	76
7	78/97	30	m	90
8	13/97	27	m	79
9	208/95	42	w	88
10	24/94	32	w	71
11	93/93	35	m	83
12	89/93	27	m	74

Tabelle A.4: Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch CO-Intoxikation, COHb = Kohlenmonoxidkonzentration im Herzblut

Lfd. Nr.	Sektions-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht
1	210/01	61	m
2	197/01	56	w
3	130/01	60	m
4	110/00	56	w
5	94/00	55	m
6	109/99	21	m
7	93/99	21	m
8	35/98	61	w
9	188/97	36	m
10	9/97	60	m
11	39/94	44	m
12	34/94	30	m
13	185/93	51	m
14	179/93	37	m

Tabelle A.5: Tabellarische Darstellung der Fälle eines Todes durch Ertrinken

Anhang B

Nummerische und statistische Daten

B.1 Nummerische Darstellung der MAP2-Expression

Lfd. Nr.	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	**CA3**	**CA2**	**CA1**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	1	1	4	0	0	2	0	2
3	5	1	2	1	0	0	0	0	0
4	1	1	2	0	0	1	1	0	0
5	12	2	3	2	40	26	28	33	79
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	12	9	4	2	50	47	37	47	80
8	0	3	6	9	67	48	36	17	79
9	0	1	6	12	3	1	0	1	5
10	0	0	2	2	5	10	15	10	40
11	3	1	0	0	0	0	0	0	0
12	3	2	2	5	34	14	17	20	45
Median	2	1	2	2	1,5	1	1,5	0,5	3,5
1. Quartil	0	0,75	0,75	0	0	0	0	0	0
3. Quartil	5	2	3,25	4,25	35,5	17	19,75	17,75	53,5
Maximum	12	9	6	12	67	48	37	47	80
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle B.1: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs CO-Intoxikation

Lfd. Nr.	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	**CA3**	**CA2**	**CA1**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
1	5	15	11	8	92	80	60	58	90
2	18	22	28	11	92	79	81	70	87
3	2	3	6	5	79	69	71	59	85
4	10	50	75	37	80	60	70	50	80
5	10	8	6	7	77	84	85	76	92
6	13	4	15	12	76	64	49	28	41
7	4	13	69	80	88	62	31	43	72
8	42	42	8	4	11	38	33	26	50
9	6	5	11	5	65	84	59	57	89
10	0	2	3	6	40	70	61	35	69
11	42	16	16	22	85	80	71	61	79
12	6	12	22	28	86	77	70	69	87
13	43	26	8	10	55	61	45	58	69
14	10	11	10	7	44	40	28	23	70
15	2	4	21	16	70	25	10	17	37
16	7	4	5	2	79	70	55	60	67
17	67	97	54	27	75	80	78	73	91
18	3	3	6	6	83	77	31	25	49
19	7	2	5	5	86	75	79	27	75
20	2	17	11	10	74	28	48	46	51
21	3	12	6	6	37	46	52	45	63
22	4	6	4	1	63	53	35	11	23
23	22	34	11	9	64	67	62	56	54
24	3	3	9	4	49	70	69	50	78
25	74	63	33	24	91	96	68	68	91
26	1	2	2	5	52	37	31	47	84
27	23	30	30	6	83	82	67	60	83
Median	7	12	11	7	76	70	60	50	75
1. Quartil	3	4	6	5	59	56,5	40	31,5	58,5
3. Quartil	20	24	21,5	14	84	79,5	70	60	86
Maximum	74	97	75	80	92	96	85	76	92
Minimum	0	2	2	1	11	25	10	11	23

Tabelle B.2: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Akutversterben

	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	**CA3**	**CA2**	**CA1**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
Median	2	2	5	6	50	24	24	21	52
1. Quartil	0	1	2	2	22	13	6	8	20
3. Quartil	6	12	18	15	63	46	40	33	70
Maximum	79	87	97	98	90	80	70	60	90
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle B.3: Prozentuale Darstellung der MAP2-Expression des Kollektivs Ersticken, zusammengesetzt aus den Kollektiven Erhängen, Ersticken und CO-Intoxikation

Lfd. Nr.	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	**CA3**	**CA2**	**CA1**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
1	5	55	47	43	0	3	2	3	0
2	79	87	94	98	77	64	63	39	60
3	2	2	4	7	42	35	13	10	34
4	0	0	2	1	50	13	5	7	22
5	6	8	67	30	37	20	25	25	52
6	0	0	1	6	49	39	27	29	35
7	12	17	24	10	84	80	55	60	89
8	24	54	97	82	56	24	48	34	35
9	55	68	95	64	54	30	21	28	67
10	4	2	12	8	0	0	0	0	0
11	0	0	0	5	22	16	9	5	11
12	2	2	0	0	33	18	9	10	20
13	11	21	24	18	49	13	6	8	11
14	38	56	21	89	11	23	6	13	35
Median	5,5	12,5	22,5	14	45,5	21,5	11	11,5	34,5
1. Quartil	2	2	2,5	6,25	24,75	13,75	6	7,25	13,25
3. Quartil	21	54,75	62	58,75	53	33,75	26,5	28,75	47,75
Maximum	79	87	97	98	84	80	63	60	89
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle B.4: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Ertrinken

Lfd. Nr.	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	**CA3**	**CA2**	**CA1**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**
1	2	12	18	15	57	46	38	47	86
2	8	16	19	17	57	35	40	34	77
3	21	14	12	12	63	46	18	23	55
4	0	4	9	8	24	36	40	37	35
5	0	0	4	3	58	24	41	19	67
6	2	7	4	7	63	12	21	30	35
7	5	11	17	44	73	45	29	20	69
8	1	1	9	15	70	13	18	21	68
9	0	5	11	9	59	17	18	19	82
10	2	5	7	6	58	23	24	14	70
11	8	16	21	31	74	75	50	28	72
12	2	2	5	3	49	53	70	54	70
13	3	13	5	3	32	27	49	23	46
14	1	3	4	3	53	34	36	36	73
15	0	0	0	3	73	56	50	36	60
16	2	5	5	2	75	48	39	26	68
17	0	0	0	0	52	34	24	33	58
18	1	2	6	18	90	71	63	53	90
19	0	2	35	5	69	65	54	27	63
Median	2	5	7	7	59	36	39	28	68
1. Quartil	0	2	4,5	3	55	25,5	24	22	59
3. Quartil	2,5	11,5	14,5	15	71,5	50,5	49,5	36	72,5
Maximum	21	16	35	44	90	75	70	54	90
Minimum	0	0	0	0	24	12	18	14	35

Tabelle B.5: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Erhängen

Lfd. Nr.	Ammonshornregion				Hirnrindenschicht				
	CA4	CA3	CA2	CA1	II	III	IV	V	VI
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	21	25	20	32	63
3	0	0	0	0	2	0	8	0	0
4	3	2	3	4	48	23	41	27	54
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2	1	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	1	3	15	15	20	30	70
8	0	0	0	0	0	1	5	2	11
9	10	2	1	15	0	0	3	0	0
Median	1	0	0	0	0	0	5	0	0
1. Quartil	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Quartil	2	1	1	3	15	15	20	27	54
Maximum	10	2	3	15	48	25	41	32	70
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle B.6: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs Hypoxie/Ischämie mit Überlebenszeit

B.2 Darstellung der statistischen Signifikanz

Region	Signifikanz Akutversterben/ Ersticken	Region	Signifikanz Akutversterben/ Ersticken
Schicht II	$p < 0{,}001$*	CA4	$p = 0{,}002$*
Schicht III	$p < 0{,}001$*	CA3	$p = 0{,}003$*
Schicht IV	$p < 0{,}001$*	CA2	$p = 0{,}031$*
Schicht V	$p < 0{,}001$*	CA1	$p = 0{,}266$
Schicht VI	$p < 0{,}001$*		

Tabelle B.7: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven Akutversterben und Ersticken, *signifikant ($p \leq 0{,}05$)

Region	**Signifikanz Akutversterben/ Erhängen**	**Signifikanz Akutversterben/ Ertrinken**	**Signifikanz Akutversterben/ CO-Intoxikation**
Schicht II	p = 0,029	p = 0,001*	p < 0,001*
Schicht III	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*
Schicht IV	p = 0,004*	p < 0,001*	p < 0,001*
Schicht V	p = 0,002*	p < 0,001*	p < 0,001*
Schicht VI	p = 0,156	p < 0,001*	p < 0,001*
CA4	p < 0,001*	p = 0,654	p = 0,006*
CA3	p = 0,016	p = 0,817	p < 0,001*
CA2	p = 0,143	p = 0,541	p < 0,001*
CA1	p = 0,454	p = 0,167	p < 0,001*

Tabelle B.8: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation gegenüber dem Kontrollkollektiv, *signifikant (p ≤ 0,008)

Region	**Signifikanz Erhängen/ Ertrinken**	**Signifikanz Erhängen/ CO-Intoxikation**	**Signifikanz Ertrinken/ CO-Intoxikation**
Schicht II	p = 0,007*	p < 0,001*	p = 0,031
Schicht III	p = 0,046	p = 0,001*	p = 0,036
Schicht IV	p = 0,010	p < 0,001*	p = 0,131
Schicht V	p = 0,032	p < 0,001*	p = 0,085
Schicht VI	p < 0,001*	p = 0,011	p = 0,432
CA4	p = 0,035	p = 0,857	p = 0,106
CA3	p = 0,226	p = 0,012	p = 0,027
CA2	p = 0,163	p = 0,001*	p = 0,017
CA1	p = 0,114	p = 0,005*	p = 0,003*

Tabelle B.9: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation untereinander, *signifikant (p ≤ 0,008)

Region	**Signifikanz in Kontroll-gruppe**	**Signifikanz in Gruppe Erhängen**	**Signifikanz in Gruppe Ertrinken**	**Signifikanz in Gruppe CO-Vergiftung**
Schicht II/III	p = 0,160	p = 0,001*	p = 0,007	p = 0,128
Schicht II/IV	p = 0,004*	p = 0,001*	p = 0,002*	p = 0,123
Schicht II/V	p < 0,001*	p < 0,001*	p = 0,003*	p = 0,116
Schicht II/VI	p = 0,819	p = 0,139	p = 0,195	p = 0,018
Schicht III/IV	p = 0,002*	p = 0,533	p = 0,033	p = 1,000
Schicht III/V	p < 0,001*	p = 0,042	p = 0,020	p = 1,000
Schicht III/VI	p = 0,053	p < 0,001*	p = 0,162	p = 0,017
Schicht IV/V	p = 0,010	p = 0,015	p = 0,814	p = 1,000
Schicht IV/VI	p < 0,001*	p < 0,001*	p = 0,017	p = 0,028
Schicht V/VI	p < 0,001*	p < 0,001*	p = 0,003*	p = 0,018
CA4/CA3		p = 0,008*	p = 0,013	
CA4/CA2		p = 0,002*	p = 0,019	
CA4/CA1		p = 0,003*	p = 0,003*	
CA3/CA2		p = 0,017	p = 0,100	
CA3/CA1		p = 0,019	p = 0,140	
CA2/CA1		p = 0,905	p = 0,345	

Tabelle B.10: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression zwischen den untersuchten Regionen innerhalb der Kollektive Akutversterben, Erhängen, Ertrinken und CO-Intoxikation, *signifikant ($p \leq 0{,}008$ für die Ammonshornregion und $p \leq 0{,}005$ für die Hirnrindenschichten), die ausgesparten Bereiche zeigten sich schon in Vortests als nicht signifikant

Anhang C

Chemikalien- und Gerätenachweis

C.1 Chemikaliennachweis

Aminoethylcarbazol-Substrat-Kit

Code-Nr.: 00-2007, Substrat für Meerrettichperoxidase
Reagenz A: Substratpuffer
Reagenz B: AEC-Chromogen-Lösung
Reagenz C: 0,6 % Hydrogenperoxid-Lösung
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA

Antikörper-Verdünnungs-Puffer

Code-Nr.: 00-3218
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA

Aquatex

Wässriges Eindeckmittel, pH $\sim$ 7,0, Merck KGaA, Darmstadt

Biotin-SP-konjugiertes IgG

Code-Nr.: 115-065-166
AffiniPure Ziege-Anti-Maus IgG (H+L), Dianova GmbH, Hamburg
Herstellung: JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA

Citronensäure-Monohydrat

EG-Nr.: 201-069-1, Merck KGaA, Darmstadt

Eukitt

Einschlussmittel, O. Kindler GmbH & Co, Freiburg

Hämalaun

nach Mayer, sauer

Waldeck GmbH & Co Division Chroma KG, Münster

MAP (microtubule-associated protein) 2a,b Ab-2

Clone AP20, Mouse Mab IgG1

Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg, Katalog-Nr.: 08582

Herstellung: Neomarkers, Inc., Fremont, USA,

Katalog-Nr.: MS-249-P

Natriumchlorid

Merck KGaA, Darmstadt

Paraffin

Erstarrungspunkt 42–44 °C, Merck KGaA, Darmstadt

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Code-Nr.: 016-030-084

Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg

Herstellung: JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

Merck KGaA, Darmstadt

Tris-Aminomethan (Tris-Base)

Pufferan $\geq 99,9\,\%$

Art.-Nr.: 5429.1, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Tris-Hydrochlorid

Pufferan $\geq 99\,\%$

Art.-Nr.: 9090.2, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Xylol

Reinst (Isomerengemisch), Merck KGaA, Darmstadt

Folgende Chemikalien wurden aus der Apotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bezogen:

Aqua destillata
Eosin 1 %, gelblich
Ethanol 100 %, vergällt
Formalin 4, 5 %, gepuffert
Wasserstoffperoxid 3 %

C.2 Ansätze der Reagenziengemische

AEC-Farblösung

50 µl Substratpuffer + 50 µl Chromogenlösung + 50 µl Hydrogenperoxidlösung auf 1 ml Aqua dest.

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Verdünnung 1:500 mit TRIS-Puffer

Primärantikörper

MAP 2a,b Ab-2, Verdünnung 1:100 mit Ak-Verdünnungspuffer

Sekundärantikörper

Biotinkonjugierter Ziege Anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:2000 mit Ak-Verdünnungspuffer

Tris-Puffer

Tris-Aminomethan 4, 5 g/5 l + Tris-Hydrochlorid 34, 25 g/5 l
+ Natriumchlorid 44 g/5 l mit Aqua dest. auf 5 Liter auffüllen, pH = 7,6

Zitratpuffer

Ansatz A: Citronensäure-Monohydrat : 2, 101 g auf 100 ml Aqua dest.
Ansatz B: Tri-Natriumcitrat-Dihydrat: 5, 882 g auf 200 ml Aqua dest.
Gebrauchslösung: 18 ml Ansatz A + 82 ml Ansatz B + 900 ml Aqua dest., pH = 6,0

C.3 Gerätenachweis

Deckgläser

Menzel-Gläser, Braunschweig

Gewebeentwässerungs- und Einbettautomat

Tissue-Tek VIP E 150, Vogel GmbH & Co. KG, Gießen

Mikroskop

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Mikrotomklingen

Microtome Blades S35, Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Vertrieb für Europa: Produkte der Medizin Ag, Köln

Mikrowelle

2450 Megahertz, maximale Leistung 800 W
E-Nr.: HF12020/02FD, P/No.: 4140WRA029M
Siemens-Elektrogeräte GmbH, München

Objektträger

SuperFrostPlus, Art.-Nr. : 041300, Menzel-Gläser, Braunschweig

Präzisionswaage

Typ 2904, Sartorius-Werke GmbH, Göttingen

Schlittenmikrotom

Jung AG, Heidelberg

Wärmeschrank

Memmert, Schwabach

Wasserbad

Typ WB 24, Medax Nagel KG, Kiel

Zellzählgerät

AssistentCounter AC-8
Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim

Anhang D

Danksagung

Die Anfertigung dieser Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Manfred Oehmichen, für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für das anhaltende Vertrauen in meine Arbeit. Durch seine langjährige Erfahrung strahlte er stets die nötige Ruhe aus und war jederzeit offen für meine Fragen. Ich danke ihm besonders für die Freiräume, die er mir ließ und die es mir ermöglichten, eigene Ideen einfließen zu lassen. Die rasante Durchsicht meiner Textentwürfe war beeindruckend und soll nicht unerwähnt bleiben.

Ganz besonders danke ich Susanne Rath, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mit ihrer unermüdlichen Geduld und Hilfsbereitschaft brachte sie mir die Geheimnisse der Immunhistochemie näher. Die vielen freundschaftlichen Gespräche verwandelten das „kalte Laborleben“ in einen Ort mit warmer, angenehmer Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin in Lübeck danke ich für die freundliche Aufnahme in ihr Team und die ständige Offenheit für Fragen und Gespräche.

Ich danke Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Friedrich für die kritische Durchsicht meiner statistischen Berechnungen. Er gab mir die nötige Bestätigung, aus den Irrungen und Wirrungen der Statistik die richtigen Tests ausgewählt und korrekt angewandt zu haben.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich durch ihr Interesse an meiner Arbeit, durch ihre Geduld und nicht zuletzt finanziell unterstützt hat.

Meinem Freund Sascha danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung bei dieser Arbeit. Seine aufbauenden Worte und seine konstruktiven Ideen gaben mir stets die Kraft, diese Arbeit motiviert weiterzuführen. Danke, dass Du mich ge- und ertragen hast!

Anhang E

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kühn
Vorname	Johanna
Geburtstag	30. Mai 1979
Geburtsort	Bad Oldesloe

Schulbildung

1985–1989	Grund- und Hauptschule Rammsee
1989–1998	Humboldt-Schule Kiel, Abitur: Juni 1998

Hochschulausbildung

1998–2001	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg
2001–2005	Klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck 1. Staatsexamen: März 2002 2. Staatsexamen: März 2004 Praktisches Jahr: Oktober 2004 – September 2005 in Lübeck 3. Staatsexamen: November 2005

Promotion

2002-2004	Labortätigkeit und schriftliche Anfertigung der Dissertation
2005	Anfertigung der Publikation (Januar - Juli 2005)

Publikation

Wesentliche Inhalte dieser Dissertation werden unter folgendem Titel in der Zeitschrift „Acta Neuropathologica“ veröffentlicht:

Kühn J, Meissner C, Oehmichen M: Microtubule-associated protein 2 (MAP2) – a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia.
[im Druck, DOI 10.1007/s00401-005-1090-9]