

Aus dem
Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. M. Graw

**Postmortale magnetresonanztomographische Befunde intrazerebraler
Hämorrhagien im Vergleich zu deren histologischer Altersschätzung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Katharina Kaliebe
aus Gräfelfing

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Zausinger

Priv. Doz. Dr. med. Tobias Freilinger

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Andreas Büttner

Dr. med. Gina Gora- Stahlberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2013

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

<i>1.</i>	<i>Einleitung.....</i>	<i>1</i>
1.1	Klinische Aspekte intrazerebraler Blutungen	1
1.2.	Diagnostik von Blut mithilfe der Autopsie / Histologie.....	2
1.2.1	Pathophysiologische Grundlagen	2
1.3.	Altersschätzung zerebraler Blutungen mithilfe der Histologie.....	3
1.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung)	3
1.3.2	Eisen-III-Färbung („Berliner-Blau-Reaktion“)	4
1.3.3	Immunhistochemie: Astrozyten und das Gliafilamentprotein GFAP.....	5
1.4	Diagnostik von Blut mithilfe der Magnetresonanztomographie.....	8
1.4.1	Magnetresonanztomographie.....	8
1.4.2	Suszeptibilität und die T2*- Gradienten-Echo-Sequenz	9
1.5	Altersschätzung zerebraler Hämatome mithilfe der MRT.....	11
1.5.1	Die Spin-Echo-(SE)-Sequenz	11
1.5.2	Biochemische / pathophysiologische Grundlagen.....	11
1.6	Besonderheiten der postmortalen Bildgebung.....	13
1.6.1	Suszeptibilitätsartefakte.....	13
1.6.2	Gewebsveränderungen durch Fixierung in Formalin	14
<i>2.</i>	<i>Fragestellung.....</i>	<i>15</i>
<i>3.</i>	<i>Material und Methode</i>	<i>17</i>

3.1	Untersuchungsmaterial	17
3.1.1	Material für die Histologie	17
3.1.2	Material für die magnetresonanztomographische Untersuchung	19
3.2	Untersuchungen	21
3.2.1	Histologie - Durchführung der Färbungen	21
3.2.2	MRT	24
3.3	Auswertung	25
3.3.1	Histologie - semiquantitative Auswertung	25
3.3.2	MRT	27
3.4	Statistische Methoden	28
3.4.1	Gehirnzählung	30
3.4.2	Befundzählung	31
4.	<i>Ergebnisteil</i>.....	32
4.1	Todesart und Lokalisation der Todesursache	32
4.2	Altersschätzung mittels GFAP- und Eisen-Färbung.....	33
4.3	Aussagekraft der MRT	40
4.3.1	Gehirnzählung	40
4.3.2	Befundzählung	42
4.3.3	Ermittlung von Suszeptibilitätsartefakten	45
4.4	Altersschätzung mittels postmortaler MRT	46
4.5	Korrelationskoeffizienten der Altersschätzungen	50
4.6	Formalinpigmente in den histologischen Präparaten	51

5.	<i>Diskussion</i>	52
5.1	Ergebnisdiskussion	52
5.1.1	Altersschätzung intrazerebraler Blutungen mittels GFAP-Färbung.....	52
5.1.2	Altersschätzung intrazerebraler Blutungen mittels Eisen-Färbung	53
5.1.3	Aussagekraft der MRT bei der Diagnostik intrazerebraler Blutungen.....	54
5.1.4	Keine Altersschätzung mittels postmortalen MRT	56
5.2	Diskussion des Studiendesigns	57
5.2.1	Fallzahl	57
5.2.2	Semiquantitative Auswertung der histologischen Präparate	58
5.2.2	Verwendung von 3 Tesla Magnetfeldstärke	60
5.3	Einfluss der Formalinfixierung	61
5.3.1	Contrast-to-Noise-Ratio in der MRT nicht berechenbar	61
5.3.2	Geringe Gewebeschrumpfung durch Formalin	62
5.3.3	Ein langes postmortem Intervall verringert die Aussagekraft der IHC	63
5.3.4	Formalin beeinträchtigt die Aussagefähigkeit der (Immun-)Histochemie	63
6.	<i>Zusammenfassung</i>	66
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	69
8.	<i>Anhang</i>	79

8.1	Abkürzungen.....	79
8.2	Chemikalien	81
8.3	Färbeprotokolle	81
8.3.1	Hämatoxylin- Eosin- Färbung	81
8.3.2	Mayer's Häkalaun	82
8.3.3	Eisen- III- Färbung („Berliner- Blau- Reaktion“)	82
8.3.4	Immunhistochemie (GFAP- Färbung).....	83
9.	<i>Danksagung</i>.....	85

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Befunde postmortaler 3-Tesla-Magnetresonanztomographieuntersuchungen intrazerebraler Blutungen von menschlichen, in Formalin fixierten Gehirnen mit deren histologischer Altersschätzung.

1.1 Klinische Aspekte intrazerebraler Blutungen

Blutungen innerhalb des knöchernen Schädels (*intrakranielle* Blutungen) sind eine häufige Todesursache des Menschen. Diese lassen sich beispielsweise in traumatisch bzw. nicht traumatisch oder auch in primär bzw. sekundär bezüglich deren Genese einteilen. Des Weiteren wird zwischen intraaxialen bzw. intraparenchymalen (das Hirngewebe selbst betreffenden) und extraaxialen bzw. extraparenchymalen Blutungen unterschieden (Wiesmann und Brückmann 1998).

Kontusionsblutungen, welche durch traumatische Hirnprellung entstehen, sind die zweithäufigste Folge sekundärer intraaxialer Verletzungen (Wiesmann und Brückmann 1998, Gentry et al. 1988). Sie kennzeichnen sich durch diffuse punktförmige (petechiale) oder auch großflächige Einblutungen, sowie Schäden der Hirnsubstanz, sowohl am Ort der Krafteinwirkung (*coup*) als auch in diametral gegenüberliegenden Hirnarealen (*contrecoup*) (Struffert und Reith 2003).

Beispiele für nicht traumatische primäre Blutungen des Gehirns sind spontane, meist ausgedehnte Blutungen im Rahmen hypertensiver Krisen, zerebraler Amyloidangiopathien, oder Gerinnungsstörungen z.B. nach Überdosierung von Antikoagulantien. Sekundäre nicht traumatische Blutungen entstehen häufig nach ischämischen Hirninfarkten (*sekundär hämorrhagische Infarkte*) (Nighoghossian et al. 2002).

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit intraaxialen (intraparenchymalen) Blutungen unterschiedlicher Genese in Großhirn, Kleinhirn oder Hirnstamm.

1.2. Diagnostik von Blut mithilfe der Autopsie / Histologie

Die konventionelle Autopsie inklusive histologischer Untersuchung ist unbestritten der Goldstandard der rechtsmedizinischen Diagnostik von Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes.

1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen

Schon lange sind eine gewisse Regelmäßigkeit in der zeitlichen Abfolge zytopathologischer Reaktionen nach einer Gewebsverletzung und deren histologisches Korrelat bekannt (Oehmichen et al. 2003 und 1981, Jänisch et al. 1990, Eisenmenger et al. 1978):

Direkt nach einer Blutung (1. Stadium, Dauer 1-2 Tage) kommt es zunächst durch Kontraktion der beteiligten Gefäße zur Stase. Dies hat u.a. durch Sauerstoffunterversorgung Nekrosen und eine perifokale Ödembildung zur Folge. Nun folgt die Resorption und Reparation (2. Stadium). An den Rand der Blutung werden Granulozyten und Makrophagen angelockt (Chemotaxis), die das untergegangene Gewebe teilweise phagozytieren. Hämosiderin ist ein Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Es wird u.a. in den Makrophagen aufgenommen und lässt sich histochemisch aufgrund des hohen Eisengehaltes leicht nachweisen (siehe 1.3.2). Nach 10 - 14 Tagen ist gelbes Hämatoidin nachweisbar und granulo-, lymphozytäre und perivaskuläre Infiltrate als Zeichen einer resorptiven Entzündung sowie neugebildetes Gefäßbindegewebe innerhalb des Hämatoms treten auf. Im 3. Stadium (Dauer mehrere

Wochen) folgt in Abhängigkeit von der Hämatomgröße die abschließende Pseudozystenbildung: Die teils spaltförmige Blutungsresthöhle wird mit einer gelblichen Flüssigkeit gefüllt und einer bindegewebigen, bräunlichen Zystenwandung mit jahrelang nachweisbaren Makrophagen ausgekleidet (Jänisch et al. 1990).

Bei einer Blutung im Gehirn erfolgt außerdem die sog. reaktive Astrogliose, eine Art Narbenreaktion von spezialisierten Gliazellen des Gehirns, den Astrozyten (siehe 1.3.3).

1.3. Altersschätzung zerebraler Blutungen mithilfe der Histologie

Im rechtsmedizinischen Kontext kann das Alter einer intrazerebralen Blutung bei der Aufklärung von Straftaten oder zur Klärung der Todesursache, u.a. in versicherungsrechtlichen Fragestellungen von maßgeblicher Bedeutung sein. Dabei werden histologische und immunhistochemische Verfahren zur Wundaltersschätzung regelmäßig angewendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Färbungen verwendet und sollen kurz erläutert werden.

1.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung)

Die H.-E.-Färbung ist eine kosten- und zeitsparende Übersichtsfärbung, die sich am Formalin-fixierten Gewebe seit vielen Jahrzehnten weltweit durchgesetzt hat. Sie schafft einen Überblick über das gesamte Gewebe, die Zellverteilung und über die Zelldifferenzierung. Die Methode ist relativ unempfindlich gegenüber Schwankungen bei der Vorbehandlung des Gewebes und der Aufwand der Färbetechnik ist gering (Lang 2006).

Mithilfe der H.-E.-Färbung lässt sich sowohl makroskopisch detektiertes Blut bestätigen, als auch eine erste Altersschätzung von Hämatomen vornehmen. So sind bei

einer sehr frischen, höchstens einige Stunden alten Blutung viele Granulozyten vorhanden (Abb.1). Diese findet man in alten, bereits abgeräumten Blutungen nicht.

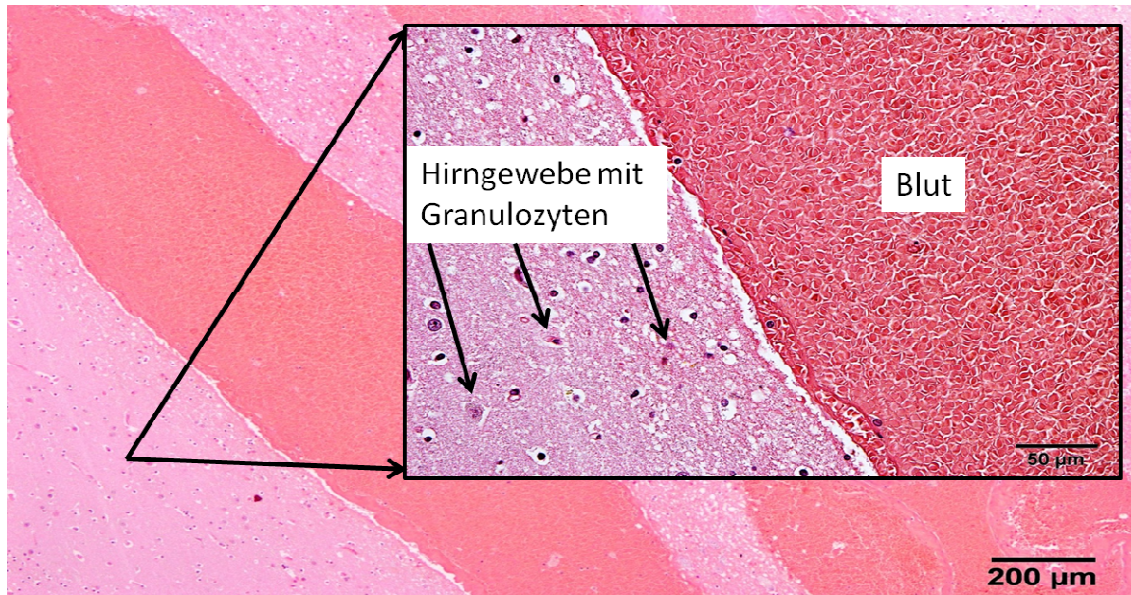


Abbildung 1: *H.-E.-Färbung einer frischen traumatischen Blutung in 40facher Vergrößerung, markierter Bildausschnitt in 200facher Vergrößerung*

1.3.2 Eisen-III-Färbung („Berliner-Blau-Reaktion“)

Größere Mengen Eisen sind im Gewebe bei Blutungen jeglicher Genese vorhanden:

Das Hämoglobin von zerstörten Erythrozyten, welches pro Molekül vier Eisenionen enthält, wird im Gewebe von Makrophagen rasch zu Hämosiderin abgebaut. Diese speichern das Hämosiderin, weshalb sie auch Siderophagen genannt werden. Mit der Eisen-Färbung werden hämosiderinhaltige Siderophagen, ebenso wie frei im Gewebe vorliegendes Eisen blau dargestellt (Lang 2006) (Abb.2). Dabei korreliert der Grad der Eisen-positiven Zellen relativ gut mit dem Alter von Hämatomen. Ein schwach positives Färbeergebnis erfordert ein Überleben von mindestens drei Tagen und beweist folglich eine sog. *vitale* Blutung (Jakob 2007, Oehmichen et al. 2003), eine stark positive Eisen-Anfärbung zeugt von einer bis zu Jahre alten Blutung, da das zu Siderin

bzw. zu Hämatoidin kristallisierte ehemalige Hämosiderin das abgeräumte Gewebe nicht mehr verlassen kann (Oehmichen et al. 2003).

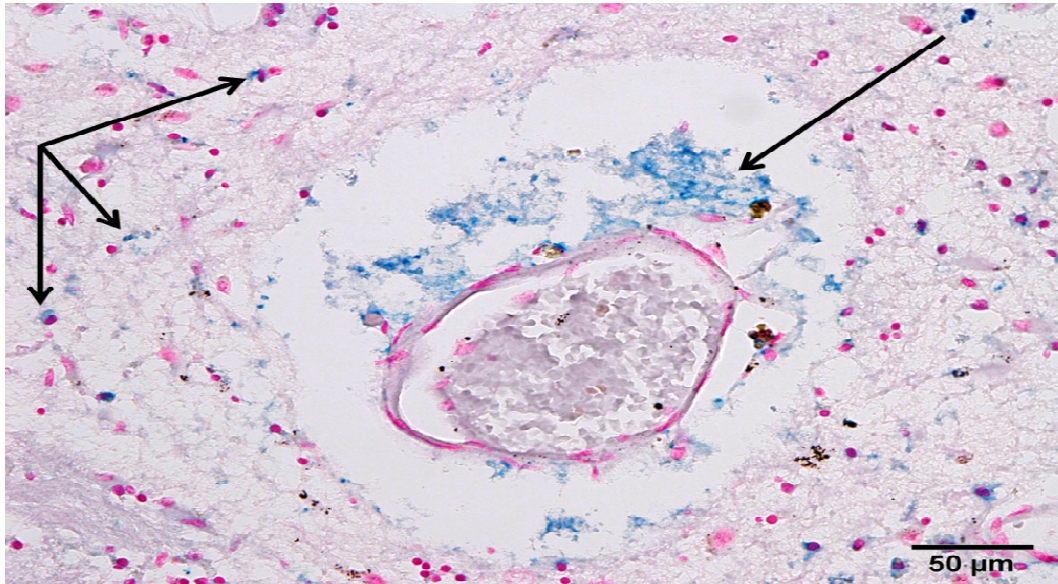


Abbildung 2: *Eisenfärbung einer 3 Wochen alten Blutung in 200facher Vergrößerung; Die Pfeile markieren blau gefärbte Eisenablagerungen bzw. Siderophagen*

1.3.3 Immunhistochemie: Astrozyten und das Gliafilamentprotein GFAP

Neben der H.-E.- und Eisenfärbung basieren die Erkenntnisse dieser Arbeit auf der immunhistochemischen Methode zur Wundaltersschätzung mittels Astrozyten und dem astrozytenspezifischen sauren Gliafilamentprotein *GFAP* (glial fibrillary acidic protein). Das Gehirn des Menschen besteht aus etwa 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen) und bis zu 50mal so vielen Gliazellen. Diese sind weit mehr als ein Stützapparat des Gehirns, wie es einst ihr Namensgeber Rudolf Virchow 1856 vermutete. Er bezeichnete sie noch als Nervenkleber (gr. „glia“ = Leim) (Kimmelberg 2004). Heute teilt man Gliazellen in Ependymzellen (Auskleidung der Ventrikel), Microglia (die Makrophagen des Gehirns), Oligodendrozyten (bilden die Myelinscheiden um die Neuronen) und Astrozyten ein (Abb. 3).

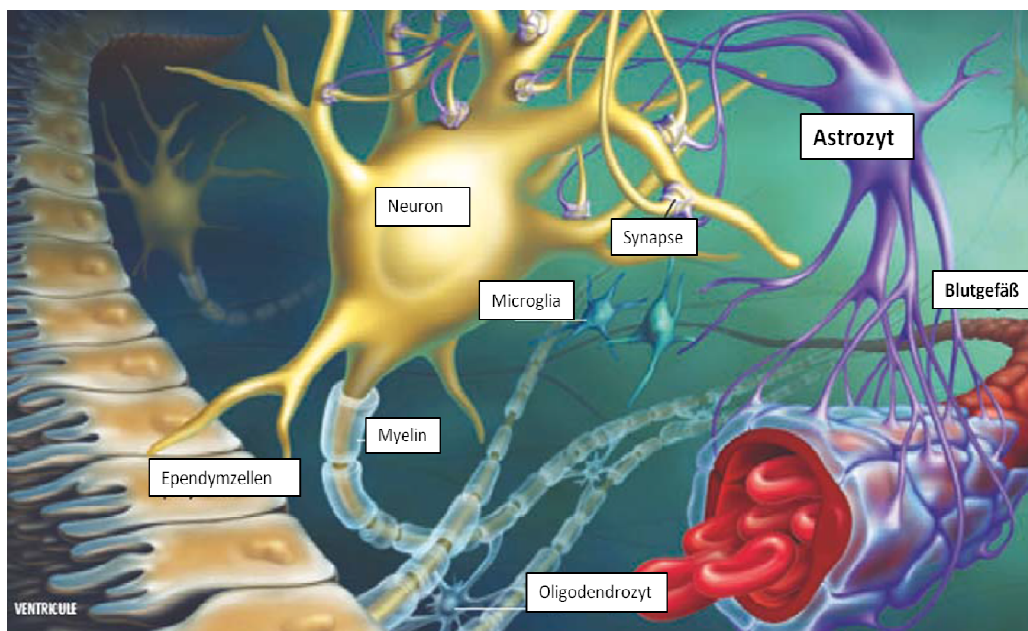


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zelltypen des Gehirns. Modifiziert nach Höpken 2005

Astrozyten machen den Hauptteil der Gliazellen aus. Ihren Namen verdanken sie vermutlich Ramon y Cajal, der 1913 fibrozytischer Glia erstmals diesen Namen beifügte (Kimmelberg 2004). Astrozyten sind vielseitige Zellen, die wichtige Aufgaben im Gehirn erfüllen (Allen und Barres 2009, Wang und Bordey 2008, Volterra und Meldolesi 2005). Gegenstand dieser Arbeit ist insbesondere ihre Fähigkeit zur Narbenbildung nach Hirnblutungen, der sog. reaktiven *Astrogliose* (Pekny und Nilsson 2005, Hausmann et al. 2000, Norton et al. 1992). Diese kann durch Anfärbung des sauren Gliafilamentproteins GFAP lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Das GFAP ist ein astrozytenspezifisches Protein, welches am Aufbau des Zytoskeletts von Astrozyten beteiligt ist (Steiner et al. 2007, Eng 1985). Isoliert wurde es Anfang der 1970er Jahre (Eng et al. 1971) und wird seitdem als hochsensitiver Marker zur Darstellung von Astrozyten genutzt (Eng et al. 2000, O'Callaghan et al. 1995).

Das GFAP kann mithilfe der Immunhistochemie (*IHC*) gezielt angefärbt werden und vor allem nach Hirnblutungen reaktive, proliferierende Astrozyten als sternförmige Zellen lichtmikroskopisch darstellen. Dabei beruht der Nachweis von GFAP auf der

Markierung bestimmter Gewebeeigenschaften (*Epitope*) durch spezifische monoklonale Antikörper, die eine hohe Affinität zu eben jenem Epitop (hier GFAP) aufweisen. Die Antikörper sind mit einem Detektionssystem gekoppelt, sodass deren Interaktion mit dem Zielprotein GFAP mikroskopisch ausgewertet werden kann (Abb.4).

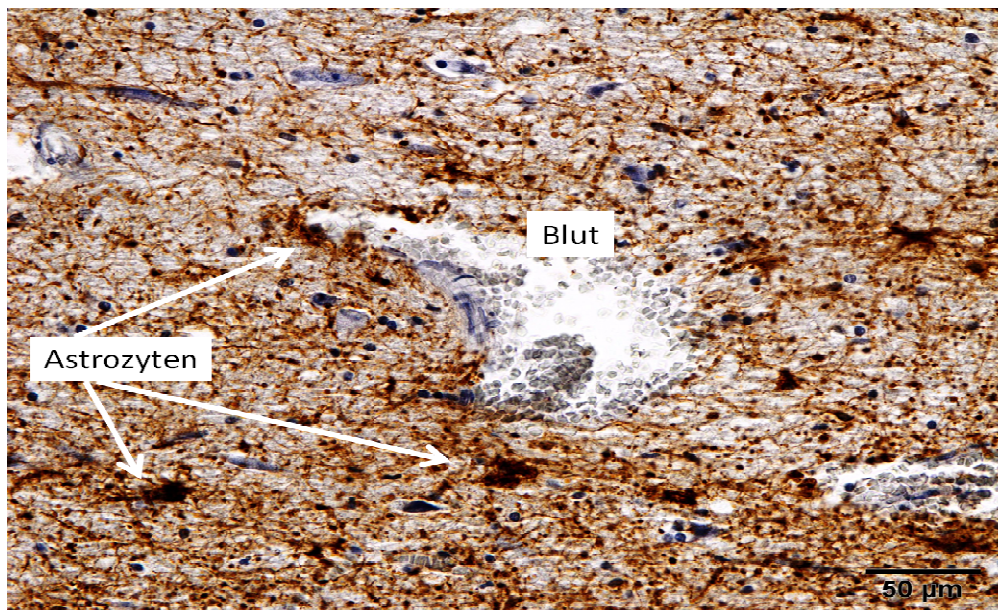


Abbildung 4: GFAP-Färbung einer frischen Blutung in 200facher Vergrößerung

In Experimenten zur Altersbestimmung intrazerebraler Blutungen mittels o.g. Methode zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen dem Alter einer Blutung und der Anzahl der gefärbten Astrozyten (Betz und Hausmann 2007, Hausmann 2006, Oehmichen et al. 2003, Hausmann et al. 2000). Bezogen auf die normalerweise vorliegende Verteilung der GFAP-positiven Zellen in unverletztem Kontrollgewebe ist eine signifikant erhöhte Anzahl GFAP-positiver, reaktiver Astrozyten im posttraumatischen Intervall zwischen einem Tag und vier Wochen zu erwarten (Betz und Hausmann 2007, Hausmann 2006, Hausmann et al. 2000, Mackenzie und Clayton 1999). Oehmichen et al. (2003) beschrieben den frühesten Nachweis von GFAP ab dem dritten Tag nach traumatischen Hirnverletzungen und Ekmark-Lewén et al. (2010) sogar einen Peak GFAP-positiver Zellen nach 3 Tagen.

1.4 Diagnostik von Blut mithilfe der Magnetresonanztomographie

Auch mittels magnetresonanztomographischer Verfahren lassen sich intrazerebrale Blutungen nachweisen. Dies ist eine besondere Herausforderung, sowohl am Lebenden als auch postmortal.

1.4.1 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (*MRT*) ist ein bildgebendes Verfahren, welches Schnittbilder von organischem Gewebe anfertigt. Sie stellt die sensitivste Methode zum Nachweis intrakranieller Blutungen dar (Huisman 2005).

Zur Bildgebung werden die positiv geladenen Kerne von Wasserstoffatomen (*Protonen*) verwendet. Protonen kreisen um ihre eigene Achse (*Spin*) und verursachen so ein kleines magnetisches Feld oder einen Dipol. Regt ein äußeres magnetisches Feld - wie in einem Magnetresonanztomograph - die Protonen an, dann richten sie sich wie Kompassnadeln mit einer bestimmten Frequenz (*Larmorfrequenz*) und Bewegung (*Präzessionsbewegung*) entlang der Feldlinien im Magnetfeld aus. Auf der Messung dieser Zustandsänderung beruht die MRT-Bildgebung (Weishaupt et al. 2009).

Der Bildkontrast (*Signalintensität*) und die Bildqualität im MRT-Bild sind von verschiedenen variierbaren Parametern abhängig (Weishaupt et al. 2009):

- Von der Protonendichte, also der Anzahl anregbarer Spins pro Volumeneinheit.
- Von der *T1-Zeit* eines Gewebes, die bestimmt, wie schnell sich die Spins von einer Anregung „erholen“ (*T1-gewichtet* = der Kontrast wird v.a. von T1 beeinflusst).
- Von der *T2-Zeit*, die bestimmt, wie rasch das MRT-Signal nach einer Anregung abklingt (*T2-gewichtet* = der Kontrast wird überwiegend von T2 beeinflusst).
- Von der Repetitionszeit (*TR*), sie ist die Zeit, die zwischen zwei Anregungen vergeht.

- Von der Echozeit (TE), sie ist diejenige Zeitspanne, die man nach Anregung bis zur Messung des MRT-Signals verstreichen lässt.
- Von der magnetischen Feldstärke eines Tomographen, gemessen in Tesla (T), sie beeinflusst das SNR (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) positiv. Ziel der MRT-Bildgebung ist ein möglichst hohes SNR zu erreichen.
- Von den unterschiedlichen Pulssequenzen (z.B. Spinecho-(SE)-Sequenz oder $T2^*$ -Gradientenecho- (GRE)-Sequenz).

Für die Diagnostik und Altersschätzung von Blut sind die Spinecho-(SE)-Sequenz und die $T2^*$ -Gradientenecho- (GRE)-Sequenz von Bedeutung, die im Folgenden erläutert werden.

1.4.2 Suszeptibilität und die $T2^*$ - Gradienten-Echo-Sequenz

Um die Nutzung der $T2^*$ -Gradienten-Echo-Sequenz (GRE - oder GE -Sequenz) für die Diagnostik von Blut zu verstehen, ist der Begriff Suszeptibilität bedeutsam. Suszeptibilität beschreibt die Empfänglichkeit eines Gewebes für ein Magnetfeld, also dessen Magnetisierbarkeit (Haacke et al. 2009, Weishaupt et al. 2009). Diese Eigenschaft ist besonders ausgeprägt an Phasengrenzen von Geweben (z.B. Luft-Gewebe-Grenzflächen) und kann zu Signalausfällen und Bildverzerrungen (*Artefakten*) führen.

Blut ist eine eisenhaltige Flüssigkeit. Das stark magnetische Eisen ist beispielweise in Blutabbauprodukten wie Hämosiderin enthalten (Thulborn et al. 1990) und ruft je nach verwendetem Sequenztyp Suszeptibilitätsartefakte hervor (Allkemper et al. 2004). Diese Eigenschaft macht man sich bei der $T2^*$ -Gradienten-Echo (GE)-Sequenz zunutze: Blut bzw. dessen eisenhaltige, paramagnetische Abbauprodukte bilden in dieser Sequenz eine fokale Signalauslöschung in Form eines dunklen (*hypointensen*),

umschriebenen Kontrasts im Vergleich zu umgebendem Hirngewebe (Valdes Hernandez et al. 2011, Atlas und Thulborn 1998, Bradley 1993). Ein zusätzlicher Vorteil bei der Verwendung dieser Sequenz ist, dass sie durch Erreichen sehr kurzer Repetitionszeiten (TR) schnelle Bildaufnahmen ermöglicht und folglich nur kurze Untersuchungszeiten nötig sind (Weishaupt et al. 2009).

Der erfolgreiche Einsatz der T2*-gewichteten Gradienten-Echo Sequenz (GE-Sequenz) als hochsensitive Nachweismethode von intrakraniellen Hämosiderinablagerungen (Ripoll und Raininko 2002, Roob et al. 1999, Atlas et al. 1988) hat dazu geführt, dass diese Sequenz heute in der klinischen Praxis nur als „*Häm-Sequenz*“ bezeichnet wird (Siebner et al. 1999).

Mit der GE-Sequenz lassen sich schon kleinste petechiale Blutungen (Greenberg et al. 2009 und 1996, Nighoghossian et al. 2002, Roob et al. 1999), ebenso wie Blutungen unterschiedlichen Alters nachweisen. Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der GE-Sequenz bei sehr frühen (hyperakuten) Blutungen zeigten beispielsweise Struffert und Reith (2003), Ripoll et al. (2003 und 2002), Linfante et al. (1999) sowie Patel et al. (1996); Ripoll und Raininko (2002) sowie Seidenwurm et al. (1989) wiesen ältere Blutungen nach. Leider konnte unter Nutzung dieser Sequenz bisher kein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Alter einer intrazerebralen Blutung und deren Signalverhalten im MRT-Bild in vivo gezeigt werden (Huisman 2005, Ripoll et al. 2003 und 2004). Hier hat sich hingegen die Nutzung der sog. Spin-Echo-(SE)-Sequenz seit langem durchgesetzt.

1.5 Altersschätzung zerebraler Hämatome mithilfe der MRT

Die MRT kann detaillierte Informationen über den zeitlichen Ablauf von zerebralen Hämorrhagien liefern (Broderick et al. 1999). Hierfür ist vor allem die Nutzung der SE-Sequenz relevant, die im Folgenden erläutert wird.

1.5.1 Die Spin-Echo-(SE)-Sequenz

Intrakranielle Blutungen werden typischerweise in fünf Stadien eingeteilt (Huisman 2005, Parizel et al. 2001, Bradley 1993):

Hyperakut (< 24 Stunden), akut (ein bis drei Tage), früh subakut (drei Tage bis eine Woche), spät subakut (> eine Woche bis ein Monat) und chronisch (> ein Monat bis Jahre).

Je nach Alter des Hämatoms besitzen dessen Abbauprodukte verschiedene magnetische Eigenschaften. Diese haben in T1/ T2-gewichteten Bildern unter Nutzung der sog. Spin-Echo-(SE)-Pulssequenz unterschiedliche, für das jeweilige Alter der Blutung charakteristische Signaleigenschaften (hypo-, iso – oder hyperintens). Diese Tatsache macht die SE-Sequenz zur Methode der Wahl für die Altersschätzung intrazerebraler Hämatome am Lebenden (Ripoll et al. 2003, Parizel et al. 2001).

1.5.2 Biochemische / pathophysiologische Grundlagen

Die chronologischen Signalveränderungen intraparenchymaler Blutungen im MRT-Bild beruhen auf einigen pathophysiologischen, biochemischen sowie physikalischen Prozessen. So ändern sich die Signalintensitäten von intrazerebralen Blutungen, die in erster Linie vom roten Blutfarbstoff Hämoglobin (Hb) und dessen Abbauprodukten bestimmt werden, in Abhängigkeit von der Zeit (Huisman 2005, Ripoll et al. 2002 und 2003, Atlas und Thulborn 1998, Bradley 1993, Thulborn et al. 1990, Atlas et al. 1988).

Ursächlich hierfür sind die verschiedenen Oxidationsstufen von Eisen, das je nach Abbaustadium unterschiedliche magnetische Eigenschaften besitzt (nach Wiesmann und Brückmann 1998):

Direkt nach Blutungsbeginn (*hyperakutes Stadium*) liegt das Hämoglobin (Hb) noch als Oxyhämoglobin (Oxy-Hb) vor. Aufgrund des hohen Sauerstoffgehaltes ist dies diamagnetisch und erzeugt deshalb keine Suszeptibilitätsartefakte, das Hämatom verhält sich wie jede andere Flüssigkeit, in T1 dunkel= hypointens, in T2 hell= hyperintens. Mit der sofort einsetzenden Gerinnung nimmt die Proteinkonzentration zu, was zu einer T1-Verkürzung führt (in T1 isointens). Im Verlauf verlieren die Hb-Moleküle nach und nach ihre Sauerstoffatome, es entsteht Deoxy-Hb, welches paramagnetische Eigenschaften hat (*akutes Stadium*). Paramagnetische Substanzen verkürzen die Relaxationszeiten (T1 und T2) von mobilen Protonen, woraus eine umschriebene Hypointensität in T1 und T2-gewichteten Sequenzen resultiert (Valdes Hernandez et al. 2011). Des Weiteren kann sich ein periläsionales Ödem bilden, das als hyperintenses, die Blutung umgebendes Band sichtbar ist (Olivot et al. 2010, Nighoghossian et al. 2002). Ab ca. dem dritten Tag (*früh subakutes Stadium*) ist die Mehrzahl der Deoxy-Hb-Molekülen zu Met-Hb-Molekülen oxidiert, was durch starke Dipol-Dipol-Wechselwirkungen neben Suszeptibilitätsartefakten auch eine zusätzliche T1-Verkürzung hervorruft (T1 hyperintens, T2 hypointens). Nach ca. einer Woche (*spät subakutes Stadium*) beginnt die Lyse der Erythrozyten, extrazelluläres Met-Hb und die absolute Proteinkonzentration nehmen ab, in der Peripherie der Blutung speichern Makrophagen eisenhaltige, sogenannte „superparamagnetische“ Hämosiderin- und Ferritin-Moleküle, die äußerst starke Artefakte hervorrufen (T1/2 hyperintens mit hypointensem Randsaum). Nach Monaten (*chronisches Stadium*) ist das Hämatom vollständig abgebaut. Allerdings können Hämosiderin und das Eisenspeicherprotein

Ferritin das Hirngewebe aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht verlassen: Es verbleibt eine umschriebene Signalauslöschung (T1/T2 hypointens).

Tabelle 1 stellt in Anlehnung an Allkemper et al. (2004), Wiesmann und Brückmann (1998) und Bradley (1993) die unterschiedlichen Signaleigenschaften von Blut und dessen Abbauprodukten mittels der beiden Basispulssequenzen SE (T1/T2-gewichtet) und GE in Abhängigkeit vom Blutungsalter gegenüber.

Tabelle 1: Verlauf von Parenchymlutungen in der MRT (SE- und GE-Sequenz)

Stadium der Blutung	Alter der Läsion	Beteiligte magnetische Substanz	SI* T1-gewichtete Sequenz (SE)	SI* T2-gewichtete Sequenz (SE)	SI* T2*-gewichtete Sequenz (GE)
Hyperakut	< 24 h	Oxy-Hb	isointens	hyperintens	hypointens
Akut	1-3 d	Deoxy-Hb	hypointens	hypointens	Stark hypointens
Früh subakut	4-7 d	Met-Hb	stark hyperintens	hypointens	stark hypointens
Spät subakut	8 d – 1 Mo	Met-Hb	stark hyperintens	Stark hyperintens	hypointens
Chronisch Rand Zentrum	> 1 Mo	Hämosiderin Hämosiderin	hypointens isointens	stark hypointens hyperintens	hypointens hypointens
SI* = Signalintensität im Vergleich zu normalem Parenchym					

1.6 Besonderheiten der postmortalen Bildgebung

Bei der postmortalen Bildgebung gibt es im Vergleich zur MRT am Lebenden einige Besonderheiten (Gora-Stahlberg 2012). Folgende Phänomene können die Beurteilbarkeit von postmortalen intrazerebralen Hämorrhagien einschränken.

1.6.1 Suszeptibilitätsartefakte

Bei der Fixierung der Hirne außerhalb des knöchernen Schädels (*ex situ*) bilden sich häufig Luftblasen, welche in die durch Formalinfixierung geschrumpften

Hirnwindungen (*Sulci*) oder in große Blutgefäße eingeschlossen werden können (Wardlaw 2011). An diesen Grenzstellen zwischen Luft und Gewebe bilden sich in T2*- gewichteten (GE)- Sequenzen häufig Suszeptibilitätsartefakte mit konsekutiven fokalen Signalverlusten (Karger et al. 1998). So kann postmortal eingeschlossene Luft leicht mit Blut verwechselt werden, wodurch die postmortale Identifikation von intrazerebralen Blutungen erschwert wird.

1.6.2 Gewebsveränderungen durch Fixierung in Formalin

Die Gehirne der vorliegenden Arbeit sind allesamt ex situ untersucht worden. Dies erfordert eine möglichst schnelle Fixierung um das Gewebe postmortal in einem ähnlichen Zustand zu erhalten wie man es in vivo vorfindet. Die am häufigsten verwendete Fixierungsart ist die Immersionsfixierung mit Formalin. Sie wurde im Jahre 1893 von Ferdinand Blum entdeckt. Folgende formalinbedingte Veränderungen der MRT-Bilder sind für die postmortale Diagnostik von Blut relevant:

- Die Formalinfixierung verlängert die Relaxationszeiten T1 und T2, was zu erhöhter Signalintensität der MRT-Bilder bis hin zu einer kompletten Kontrastumkehr von grauer und weißer Substanz führen kann (Jones et al. 1998). Dies beeinträchtigt die magnetresonanztomographische Diagnostik von Blut.
- Die Fixierung führt zu einer Abnahme des Wassergehaltes in Geweben, so dass von einer geringen Gewebeschrumpfung nach Formalinfixierung auszugehen ist (Fox et al. 1985). Blutungen können im MRT-Bild minimal kleiner erscheinen als sie tatsächlich sind.

2. Fragestellung

In der rechtsmedizinischen Praxis stellt sich regelmäßig die Frage nach der Todesursache und der Todesart. Als Beispiele seien hier die Klärung der Schuldfrage bei einem Unfallhergang in versicherungstechnischen Fragestellungen (kommt z.B. eine Blutung als Unfallursache infrage oder ist sie sekundäre Unfallfolge) und das weite Feld der Forensik in strafrechtlichen Verfahren genannt (z.B. Schlägerei eine Woche vor dem Tod und Sturz am Tag des Todes). Um die Kausalität eines zum Tode führenden Ereignisses zu klären ist die Rekonstruktion des tödlichen Geschehensablaufs maßgeblich. Hierfür kann das Alter einer intrazerebralen Blutung von entscheidender Bedeutung sein. Histologische Methoden zur Wundaltersschätzung sind in der rechtsmedizinischen Praxis zwar seit langem etabliert, bildgebende Verfahren hingegen nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, postmortale 3-Tesla Magnetresonanztomographie-Befunde von intrazerebralen Blutungen mit deren histologischer Altersschätzung zu vergleichen.

Hierzu sollen im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.** Stimmt die histologische Altersschätzung intrazerebraler Blutungen der vorliegenden Arbeit mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen überein?
- 2.** Ist die postmortale MRT eine sinnvolle Ergänzung zur Histologie bei der Diagnostik von intrazerebralen Blutungen (oder gar eine gleichwertige Methode)?

3. Erlauben - ausgehend von den bekannten Möglichkeiten der MRT zur Altersschätzung von Blutungen in vivo – auch postmortale MRT-Befunde von intrazerebralen Blutungen Rückschlüsse auf deren Alter? Kann folglich die postmortale MRT einen Beitrag zur Altersschätzung von intrazerebralen Blutungen leisten?

4. Welche Probleme kann die Formalinfixierung bei der histologischen und magnetresonanztomographischen Diagnostik von Blut bereiten?

3. Material und Methode

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Material für die Histologie

Im Rahmen einer vorangehenden Dissertation wurden postmortal MRT-Bilder von menschlichen Gehirnen aus dem klassischen Fallspektrum der Rechtsmedizin angefertigt und deren Ergebnisse mit der konventionellen Autopsie verglichen (Gora-Stahlberg 2012).

Aus dieser Studie wurden 23 Fälle ausgewählt, die autoptisch (*makroskopisch und histologisch*) folgende Charakteristika aufwiesen: Intrazerebrale Blutungen unterschiedlicher Anzahl (pro Gehirn von einem bis zu fünf ausgewählte Areale), Lokalisation, Ursache (traumatisch und nicht traumatisch), Größe (einige Millimeter bis mehrere Zentimeter) und unterschiedlichen Alters (Minuten bis Jahre). Ein neuropathologisch befundfreies Gehirn (gesamt n=24) diente als Negativkontrolle, sechs der Gehirne wiesen sieben Hirninfarkte mit makroskopischer Einblutung auf. Die Gehirne stammten aus sechs weiblichen und 18 männlichen Leichen. Das Alter der Personen war zu ihrem Todeszeitpunkt eine Stunde bis 81 Jahre (arithmetischer Mittelwert: 52,5 Jahre). Das Alter der Blutungen war bei allen Verstorbenen bekannt. Dies wurde vom Beginn der klinischen Manifestation bis zum eingetretenen Tod berechnet (einige Minuten bis mehrere Jahre).

Die Gehirne stammten aus dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Die Verstorbenen waren von der Staatsanwaltschaft beschlagnahmt, die Leichenöffnung war nach § 87 IV StPO von einem Richter bzw. der Staatsanwaltschaft angeordnet und eine ergänzende neuropathologische Untersuchung angezeigt. Die Öffnung der Leichen und die Entnahme der Gehirne erfolgten jeweils

nach einem Standardobduktionsprotokoll und wurde von 2 Ärzten der Rechtsmedizin München durchgeführt, von denen mindestens einer Facharzt war (§ 87 II StPO).

Die neuropathologische Begutachtung wurde von einem Facharzt für Rechtsmedizin durchgeführt (Herr Prof. Dr. med. A. Büttner).

Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen des Gehirns von allen Seiten angefertigt, dann Kleinhirn und Hirnstamm abgetrennt und schließlich Frontalschnitte von frontal nach okzipital angefertigt. Die Scheiben hatten eine Dicke von etwa einem cm. Bei der Schnittführung lag der jeweils zu beurteilende Schnitt immer direkt hinter dem vorangegangenen Schnitt, sodass sich die angeschnittenen Strukturen von einem Schnitt zum nächsten verfolgen ließen (Gora-Stahlberg 2012). Alle Gehirnscheiben wurden in einer 6,5 %igen, wässrig gepufferten Formaldehyd-Methanollösung (=Formalin) (pH7,4 Temperatur 21°C) gelagert. Von jeder Gehirnscheibe mit makropathologisch detektierter Blutung wurden Fotos angefertigt.

Je nach Lokalisation der Blutungen wurden aus den jeweiligen Gehirnscheiben insgesamt 39 Gewebsausschnitte (10x10x3mm große Blöckchen) von Herrn Prof. Dr. med. A. Büttner für die histologische Untersuchung entnommen. Aus 12 Gehirnen wurde je eine Gewebeprobe entnommen, bei den restlichen acht Gehirnen jeweils zwei oder mehr Gewebeproben (aus vier Gehirnen zwei Proben, aus zwei Gehirnen drei Proben, aus je einem Gehirn je vier und je fünf Proben). Insgesamt wurden folgende topographische Regionen untersucht: Kleinhirn (n=3), Pons (n=2), Mesencephalon (n=1), Thalamus (n=2), Hypothalamus (n=2), Temporal- (n=5) Occipital- (n=2) Parietal- (n=4) und Frontallappen (n=9), Basalganglien (n=5), Hippocampus (n=2) und Corpus callosum (n=2).

Nach dem Zuschneiden in die oben genannten Blöcke erfolgte die Paraffineinbettung, daraufhin die histologische und immunhistochemische Färbung (siehe 3.2.1).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht des Untersuchungsmaterials.

Tabelle 2: Übersicht des Untersuchungsmaterials

Charakteristik	Anzahl der Hirne (n= 24)	Anzahl der Läsionen (n=39)
Negativkontrolle (o.p.B)	1	2
Blutungsursache		
Spontan (Marcumar)	1	1
Infarkt	6	7
Trauma	15	28
OP-Komplikation (Tumor)	1	1
Blutungsalter		
< 24 Stunden	11	20
1 - 3 Tage	4	9
3 - 7 Tage	1	1
1 Woche - 1,5 Monate	3	3
> 1,5 Monate	5	6

3.1.2 Material für die magnetresonanztomographische Untersuchung

Vor der neuropathologischen und histologischen Untersuchung waren MRT-Untersuchungen der Gehirne im Rahmen der o.g. Dissertation (Gora-Stahlberg 2012) durchgeführt worden. Dies war in der Abteilung für Neuroradiologie im Klinikum der Universität München-Großhadern (LMU) von einer erfahrenen Fachärztin für Neuroradiologie (Frau PD Dr. med. J. Linn) verblindet - d.h. ohne Kenntnis von Identität und Diagnose - erfolgt.

Hierfür war ein 3-Tesla-MRT-Scanner (Signa®HDx 3,0 T, GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG, Solingen, Deutschland) aus der klinischen Routinediagnostik mit einer hochauflösenden 8-Kanal-Kopfspule (GE Healthcare, Milwaukee, USA) verwendet worden.

Folgende drei MRT-Sequenzen waren durchgeführt worden:

- T1-gewichtete *3D-fast-spoiled-gradient-echo*-Sequenz (FSPGR 3D)
- protonendichte-gewichtete *Fast-spin-echo*-Sequenz (FSE-XL)
- T2*-gewichtete Gradientenechosequenz (GE) („Häm-Sequenz“)

Die Sequenzparameter waren für die Untersuchungen wie folgt gewählt worden:

Tabelle 3 (Gora-Stahlberg 2012): Sequenzparameter¹

Sequenz	FSPGR 3D (T1)	FSE-XL (PD)	GE (T2*)
TR (ms)	6,1	7100,0	600,0
TE (ms)	3,2	13,4 Eff. TE/2: 92,0	9,0
FOV (mm)	180	220	220
Flip angle (°)	15		20
Schichtdicke (mm)	1,0	3,0	3,0
NEX (n)	1,0	2,0	1,0
Matrix	300x300	320x320	320x320
Sonstige Parameter	Prep Time: 1200ms	Spacing: 0,3mm	Spacing: 0,3mm
Messzeit (min:s)	17:14	3:55	1:41

Aufgrund der räumlichen Entfernung zum Institut für Rechtsmedizin waren die Gehirne ex-situ und in Formalin fixiert untersucht worden. Ausschlusskriterium war

¹ Parameter: TR: Repetitionszeit (Time to Repeat), TE: Echozeit (Time of Echo), FOV: Field of View, Flip angle: Anregungswinkel, NEX: Anzahl an Anregungen (Number of Excitations), Matrix: Frequenz x Phase

fortgeschrittene Fäulnis, es wurde in keinem Fall ein Postmortem-Intervall (PMI) (= Zeit zwischen Eintritt des Todes und Fixierung) von 4 Tagen überschritten.

Für weitere Details zur Vorbereitung und genauen Durchführung der MRT-Untersuchungen wird auf die o.g. Dissertation (Gora-Stahlberg 2012) verwiesen.

3.2 Untersuchungen

3.2.1 Histologie - Durchführung der Färbungen

3.2.1.1 Vorbehandlung der Gewebe

Nach der Fixierung erfolgte die Paraffineinbettung: Um das Formalin auszuwaschen und um spätere Paraformaldehyd-Niederschläge in den Präparaten zu vermeiden, musste das Gewebe zunächst gründlich mit Leitungswasser gewässert werden. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Einbettmediums Paraffin erfolgte nun das stufenweise Entwässern mittels einer 70- bis 99,9%igen Alkohollösung. Nach der Entwässerung wurde der Alkohol mithilfe des hydrophoben Lösungsmittels Xylol entfernt. Dies ermöglicht die nachfolgende Durchtränkung mit flüssigem Paraffin (bei ca. 60°C) und dessen Schnellinfiltration in das Gewebe.

Die Paraffinblöcke wurden in einem Gefrierschrank über Nacht gekühlt, anschließend in ein Schlittenmikrotom (Microm HM 400) eingespannt und jeweils ca. 20-30 Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 2,0-4,0 Mikrometern abgetrennt. Diese wurden in ein auf etwa 35 °C erwärmtes ‚Streckbad‘ (aus Aqua destillata) verbracht, in dem sich die Paraffinschnitte entfalten konnten. Die Schnitte wurden manuell blasen- und faltenfrei auf Adhäsiv-Objektträger (Menzelgläser Superfrost Plus) aufgezogen.

Nach 24-stündigem Trocknen im Brutschrank (ca. 40 °C) waren die Präparate für die Färbungen fertiggestellt.

3.2.1.2 Hämatoxylin – Eosin – Färbung (H.-E. – Färbung)

Das Färbeprinzip beruht auf Kernfärbung mittels des aus Blauholz gewonnenen Farbstoffes Hämatin, welches zu Hämatoxylin oxidiert wird. Aus diesem entsteht nach künstlicher Reifung unter Zugabe von Alaunsalzen (Beize) durch Komplexbildung ein Hämalaunlack. Im Endprodukt findet sich eine kontrastreiche Darstellung der Kerne in blau-violett-schwärzlichem Farbton. Zytoplasma, Interzellulärsubstanz und Erythrozyten hingegen stellen sich mithilfe der Eosin-Gegenfärbung rötlich dar (Lang 2006, Romeis 1989). Blut ist aufgrund seiner orange- bis tiefroten Farbe und der teils ungeordneten Verteilung im Gewebe oder um Blutgefäße hervorragend nachweisbar.

Alle detektierten Blutungen wurden unter dem Mikroskop mithilfe eines wasserfesten Stifts auf dem Deckglas des Objektträgers markiert, um das Blutungsareal für die immunhistochemisch gefärbten Präparate sicher lokalisieren und so von unverletztem Gewebe abgrenzen zu können (s.u.).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Färbung „Mayer's Hämalaun“ verwendet (zur Herstellung siehe 8.3.2 im Anhang, oder eine fertige Hämalaun-Lösung unter 8.2). Das gesamte Färbeprotokoll ist unter 8.3.1 im Anhang zu finden.

3.2.1.3 Eisen- (III)- Färbung (Berliner-Blau-Reaktion)

Mit der Eisen-III-Färbung (*Berliner-Blau-Reaktion*) werden hämosiderinhaltige Siderophagen und frei im Gewebe vorliegendes Eisen blau dargestellt.

Zunächst muss hierfür das an Ferritin und Hämosiderin gebundene Eisen durch die Einwirkung von Salzsäure freigegeben werden. Nach der Methode von Perls (1867) reagieren die dreiwertigen Eisenionen unter Zugabe von gelbem Blaulaugensalz im sauren Milieu zu unlöslichem, blauen Berlinerblau:



Zur Gegenfärbung der Zellkerne setzt man bei der Berliner-Blau-Reaktion Kernechtrot ein, welches Zellkerne hellrot darstellt. Lichtmikroskopisch sind folglich Eisen blau, Zellkerne hellrot und der Hintergrund rosa dargestellt. Das Färbeprotokoll ist unter 8.3.3 im Anhang zu finden.

3.2.1.4 Immunhistochemische Untersuchung (GFAP)

Die Immunhistochemie dient der Identifizierung und Lokalisation zellulärer Antigene (hier GFAP) durch spezifisch gegen diese Antigene gerichtete Antikörper (siehe 1.3.3). Eine Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch farbgebende Marker sichtbar gemacht. Der Nachweis von GFAP erfolgte in dieser Arbeit nach einer modifizierten, hoch sensitiven Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode (Boenisch 2003, Hsu et al. 1981). Dabei handelt es sich um ein indirektes immunhistochemisches Nachweisverfahren, welches aus den folgenden drei Grundschrinen besteht:

- a) gegen das untersuchte Antigen (=GFAP) gerichteter Primärantikörper,
- b) Biotin-konjugierter Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet,
- c) Peroxidase-konjugiertes Streptavidin, welches an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet und gleichzeitig die Farbreaktion katalysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler primärer Anti-Maus-Antikörper verwendet (siehe 8.2), welcher durch seine hohe Affinität zu GFAP ein spezifisches Signal für das Vorhandensein von Astrozyten ergibt. Um eine unerwünschte

Hintergrundfärbung zu verhindern wurden vor Beginn der Färbungen mithilfe von Nicht-immun-Serum zunächst unspezifische Bindungen blockiert. Danach folgte die Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration für die Bebrütung (*Inkubation*) mit dem Primärantikörper. Sie betrug 1:100 (Antikörper: Verdünnungslösung = 1:100). Da der Antikörper als Protein der Beeinflussung durch pH-Wert und Salzkonzentration in der Lösung unterliegt, wurde eine Pufferlösung (phosphate-buffered-saline, PBS) bei einem pH von 7,2-7,4 verwendet. Die Inkubation der Antikörperlösung (a) auf den Präparaten erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurde der Primärantikörper an das Detektionssystem (b/c) mithilfe des Zymed Immunostainers (Firma Zymed, South San Francisco, USA) gekoppelt. Die nachfolgende Färbung erfolgte anhand des Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Chromogens (DAB), welches die Antigen-Antikörper Bindung als braunes Präzipitat sichtbar macht (Boenisch 2003). Abschließend wurde mit Mayer's Hämalun gegengefärbt. Dieser Schritt dient wie bei anderen histochemischen Färbungen der leichteren Orientierung im gefärbten Gewebe und der Kontrastierung des nun gefärbten Antigens GFAP.

Zusätzlich wurden einige ausgewählte Negativkontrollen anstelle des Antiserums (= anti-GFAP-Antikörper) nur mit PBS-Puffer inkubiert. Hier darf nur die Autofluoreszenz des Gewebes erkennbar sein. Dies war bei allen Kontrollen der Fall.

Das Färbeprotokoll ist im Anhang unter 8.3.4 zu finden.

3.2.2 MRT

Alle MRT-Bilder aus den o.g. vorliegenden Sequenzen (3.1.2) standen im Dicom-Format für die vorliegende Arbeit zur Verfügung. Ebenso lagen die im Rahmen der vorangehenden Dissertation (Gora-Stahlberg 2012) erhobenen MRT-Befunde vor. Diese Befunderhebung war im Vorfeld von Frau PD Dr. med. J. Linn *verblindet*, d.h.

ohne Kenntnis von Identität, Diagnose und Todesursache der Verstorbenen für die o.g. Dissertation vorgenommen worden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle für die histologische Untersuchung ausgewählten Hirnregionen mit makropathologischer Blutung nochmals von zwei unabhängigen Beobachtern (Frau Dr. med. G. Gora-Stahlberg, Frau K. Kaliebe) in der T2*-gewichteten GE-Sequenz auf ggf. altersabhängig unterschiedliche Blutungszeichen untersucht (siehe 3.3.2). Da hierfür die Kenntnis der jeweiligen Hirnregionen sowie des tatsächlichen Alters der Blutungen nötig waren, musste in der Zweit-Begutachtung auf eine verblindete Befunderhebung verzichtet werden. Folglich wurde diese *unverblindet* durchgeführt, d.h. die jeweiligen Lokalisationen der Blutungen, die Identität, Diagnose und Todesursache aller Verstorbenen sowie die im Vorfeld von Frau PD Dr. med. J. Linn erhobenen MRT-Befunde waren bekannt.

Für die unverblindete Befunderhebung wurde das Bildbearbeitungsprogramm K-PACS, Version 1.6.0 (Free DICOM Workstation) verwendet.

3.3 Auswertung

3.3.1 Histologie - semiquantitative Auswertung

Die mikroskopische Auswertung wurde mithilfe eines Carl Zeiss Axiostar Plus Mikroskopes und eines Olympus BX 43 Mikroskopes bei 40-, 100- und 200-facher Vergrößerung von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt (Herr Prof. Dr. med. A. Büttner, Frau K. Kaliebe). Fotografien aller Präparate in allen Färbungen und Vergrößerungen wurden mit einer im Mikroskop integrierten Olympus DP 25 Digitalkamera angefertigt.

Die Altersschätzung der Blutungen erfolgte indirekt durch die Ermittlung des Grades der GFAP/Eisen-Anfärbbarkeit (Immunreaktivität) der Astrozyten/Siderophagen und/oder des freien Eisens in unmittelbarer Umgebung der Blutungen. Hierzu wurden unter semiquantitativen Gesichtspunkten in jedem Präparat jeweils fünf Gesichtsfelder in direkter Umgebung der Blutungen bzw. der Infarkte ausgewertet und in Anlehnung an die Klassifikationen zur Wundaltersschätzung von Hausmann und Betz (2000), Hausmann et al. (1999) und Oehmichen et al. (1998) in folgende Klassen eingeteilt:

0 = kein GFAP-/ Eisen-Nachweis

1 = geringe GFAP-/Eisen-Anfärbung durch einzeln markierte Astrozyten/Siderophagen

2 = zahlreiche, locker verteilte oder schmale bandförmige GFAP-/Eisen-Ablagerungen

3 = dicht gepackte oder zusammengelagerte GFAP-/Eisen-Ablagerungen, in Form von dichten Haufen, Bündeln oder breiten bandförmigen Strukturen.

Physiologischerweise auch in unverletztem Kontrollgewebe nachweisbare GFAP-positive Astrozyten (Betz und Hausmann 2007) wurden berücksichtigt, indem gesundes, in weiter Entfernung zur Blutung befindliches Kontrollgewebe als intraindividueller Referenzwert mit den pathologisch veränderten Gewebeabschnitten verglichen wurde (Li et al. 2010). So mussten, um einen Zählwert von $n=1$ zu erhalten, direkt um die Läsion deutlich mehr Astrozyten angefärbt sein als in der unverletzten Umgebung. Wiesen beide Areale gleich viele Astrozyten auf, so erfuhr die Läsion einen Zählwert von $n=0$.

3.3.2 MRT

Folgende Einteilungen wurden für die unverblindete Auswertung der MRT-Bilder in der T2* gewichteten GE-(„Häm“-)-Sequenz vorgenommen:

1.) Das Alter der Blutungen wurde in Anlehnung an Bradley (1993) folgenden numerischen Werten zugeteilt:

- 1** = hyperakute Blutung (< 24 Stunden)
- 2** = akute Blutung (1- 3 Tage)
- 3** = früh subakute Blutung (>3 Tage < 1 Woche)
- 4** = spät subakute Blutung (> 1 Woche < 1 Monat)
- 5** = chronische Blutungen (> 1 Monat bis Jahre).

2.) Die Größen der Blutungen wurden in folgende 4 Kategorien eingeteilt:

- 1**= sehr klein (< 1 cm)
- 2**= klein (1,1cm – 2.0 cm)
- 3**= mittel (2,1 cm – 3,5 cm)
- 4**= groß (> 3,6 cm)

Die Größenermittlung erfolgte durch Messung des größtmöglichen Längs- oder Querdurchmessers.

3.) In Anlehnung an Allkemper et al. (2004) und Ripoll et al. (2004) wurde die Signalintensität der Blutungen im Vergleich zur umgebenden weißen Substanz (dunkel bis hell = hypointens bis hyperintens) in 5 Klassen wie folgt eingeteilt:

- 0** = homogen hypointens
- 1** = inhomogen hypointens
- 2** = isointens
- 3** = gemischt hypointens/isointens
- 4** = gemischt mit hyperintensiven Arealen

Da große Blutungen (definiert als Durchmesser > 3,6 cm) typischerweise unterschiedliche Signalintensitäten im Zentrum und im Randbereich aufweisen (Ripoll

et al. 2004), wurden diese Hämatome (n=5) in einen zentralen Bereich und einen Randbereich unterteilt, welcher jeweils ebenso nach o.g. Kriterien ausgewertet wurde.

Korrektur von Artefakten

Um die Verwechslungsgefahr von Luftartefakten mit Blut zu minimieren, erwiesen sich die beiden anderen durchgeführten Sequenzen (T1-gewichtete FSPGR-3D-Sequenz und protonendichte-gewichtete-FSE-XL-Sequenz) als hilfreich. In diesen Sequenzen sind Gewebsschäden gut von Luft abgrenzbar, da sich ausschließlich Luft schwarz darstellt, Gewebsdefekte wie Blut hingegen inhomogen hypo-, iso- oder hyperintens.

3.4 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software R (R Development Core Team 2012) vorgenommen.

Die Befunde der H.-E.- Färbung stellten den Goldstandard dar.

Die Zahlenangaben der im Ergebnisteil (4.3) aufgeführten MRT-Befunde beruhen sowohl auf der *verblindeten* Befunderhebung aus der bereits erwähnten vorangehenden Dissertation, als auch auf der *unverblindeten* Zweit-Begutachtung (3.2.2). Beides ist jeweils ausdrücklich gekennzeichnet.

Von den 24 untersuchten Gehirnen wurde bei acht Gehirnen mehr als eine Lokalisation untersucht. In diesen Fällen würde es einen Unterschied machen, ob in die statistische Auswertung der Übereinstimmung von histologischer und neuroradiologischer Untersuchung ein Gehirn mit z.B. vier Blutungsherden mit dem Wert n=1 (Gehirnzählung) oder n=4 (Befundzählung) eingeht. Deshalb wurden in Anlehnung an Gora-Stahlberg (2012) folgende zwei Bezüge unterschieden:

- *Gehirnzählung* – hier wird gezählt, ob ein Gehirn die gleichen (auch gleich lokalisierten) MRT-Befunde aufweist wie die histologischen Befunde. Bei Übereinstimmung, erfährt das Gehirn einen Zählwert von $n=1$, bei fehlender Übereinstimmung $n=0$.
- *Befundzählung* – hier geht bei einem Gehirn die Zahl ($n=x$) der übereinstimmenden Befunde in die Auswertung ein.

Es wurde sowohl für die Gehirnzählung als auch für die Befundzählung der Anteil an „falsch positiven Gehirnen“ (Begriff fortan ohne An- und Abführungszeichen geführt) bzw. falsch positiven Befunden ermittelt. Ferner wurde das relevante Gütemaß Sensitivität berechnet und jeweils dessen *unteres* (UKI) und *oberes* (OKI) 95%iges *Konfidenzintervall* angegeben. Entsprechend Brown et al. (2001) wurden die Konfidenzintervalle für die Sensitivität nach der Methode von Agresti und Coull (1998) mit

$$(UKI, OKI) = (\text{Sensitivität, Spezifität}) \pm z_{1-\alpha/2} \sqrt{\text{Var}(Se_{AC})}$$

$$\text{Var}(Se_{AC}) = \frac{Se_{AC} (1 - Se_{AC})}{n_1 + z_{1-\alpha/2}^2}$$

$$Se_{AC} = \frac{s_1 + z_{1-\alpha/2}^2/2}{n_1 + z_{1-\alpha/2}^2}$$

geschätzt. Dabei bezeichnet s_1 den Anteil richtig positiver Gehirne, n_1 die Gesamtzahl an Beobachtungen und $z_{1-\alpha/2}$ das $1-\alpha/2$ Perzentil einer Standardnormalverteilung.

Da keine falsch negativen Befunde vorlagen, konnten für die Spezifität der Gehirnzählung und für den Anteil falsch positiver Gehirne bzw. Befunde keine Konfidenzintervalle ermittelt werden.

3.4.1 Gehirnzählung

Bei der Gehirnzählung wurde die Aussagesicherheit der verblindeten und unverblindeten MRT-Begutachtung durch folgende drei Größen bestimmt:

- $Sensitivität = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Gehirne}}{\text{Anzahl richtig positiver Gehirne} + \text{Anzahl falsch negativer Gehirne}}$
- $Spezifität = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Gehirne}}{\text{Anzahl richtig negativer Gehirne} + \text{Anzahl falsch positiver Gehirne}}$
- $Anteil\ falsch\ positiver\ Gehirne = \frac{\text{Anzahl falsch positiver Gehirne}}{\text{Anzahl richtig positiver Gehirne} + \text{Anzahl falsch positiver Gehirne}}$

Als *richtig positiv* wurde ein Gehirn gezählt, bezogen auf den histologischen Befund, wenn mittels der MRT die gleiche Anzahl an Befunden an denselben Lokalisationen wie bei der histologischen Befunderhebung entdeckt werden konnte.

Als *falsch positiv* wurde ein Gehirn gezählt, bezogen auf den histologischen Befund, wenn mittels der MRT Blut an einer bestimmten Lokalisation festgestellt wurde, wo die histologische Untersuchung nichts dergleichen festgestellt hatte.

Als *richtig negativ* wurde ein Gehirn gezählt, bezogen auf den histologischen Befund, wenn weder histologisch noch mittels der MRT Blut festgestellt werden konnte.

Als *falsch negativ* wurde ein Gehirn gezählt, bezogen auf den histologischen Befund, wenn ein mittels der histologischen Autopsie entdeckter Blutungsherd nicht mittels der MRT bestätigt werden konnte.

3.4.2 Befundzählung

Bei der Befundzählung wurde die Aussagesicherheit der verblindeten und unverblindeten MRT-Begutachtung durch folgende drei Größen bestimmt:

- $Sensitivität = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Befunde}}{\text{Anzahl richtig positiver Befunde} + \text{Anzahl falsch negativer Befunde}}$
- $\text{positiv prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Befunde}}{\text{Anzahl richtig positiver Befunde} + \text{Anzahl falsch positiver Befunde}}$
- $\text{Anteil falsch positiver Befunde} = \frac{\text{Anzahl falsch positiver Befunde}}{\text{Anzahl richtig positiver Befunde} + \text{Anzahl falsch positiver Befunde}}$

Als *richtig positiv* wurde ein Befund gezählt, wenn auch mittels der MRT diese Blutung an derselben Lokalisation entdeckt werden konnte wie mithilfe der Histologie.

Als *falsch positiv* wurde ein Befund gezählt, wenn eine mittels der MRT entdeckte Blutung histologisch nicht an derselben Lokalisation bestätigt werden konnte.

Als *falsch negativ* wurde ein Befund gezählt, wenn eine mittels der histologischen Autopsie entdeckte Blutung nicht oder nicht an derselben Lokalisation mittels der MRT bestätigt werden konnte.

Die Berechnung der Spezifität erwies sich aufgrund von nicht vorhandenen richtig negativen Befunden als nicht möglich, stattdessen wurde der positiv prädiktive Wert ermittelt.

Die diagnostische Güte der histologischen Schnitte sowie der MRT-Bilder in Bezug auf das Alter detektierter Blutungen wurde aufgrund der geringen Fallzahl mittels robuster Rangkorrelationen unter Verwendung des R -Paketes „Kendall“ (A.I. McLeod 2011, Version 2.2) ermittelt. Dabei wurde ein globales Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ angenommen, wobei das lokale Signifikanzniveau entsprechend der Methode von Holm (1979) adjustiert wurde.

4. Ergebnisteil

4.1 Todesart und Lokalisation der Todesursache

Von der Grundgesamtheit (n=24) starben gemäß der rechtsmedizinischen Obduktionsprotokolle

- fünf Personen eines natürlichen Todes,
- zwei eines ungeklärten Todes und
- 17 eines nicht natürlichen Todes.

Die nicht natürlichen Todeshergänge waren: Stürze (n=9), Verkehrsunfälle (n=4), Folgen einer Operation (n=3), Stichverletzungen (n=1) und Hirnmassenblutung infolge Überdosierung von Marcumar (n=1).

Die natürlichen Todeshergänge waren: V.a. plötzlichen Herztod bei KHK / Herzinsuffizienz (n=2), rupturiertes Hirnbasisaneurysma (n=1) und Lungenarterienembolie (n=1).

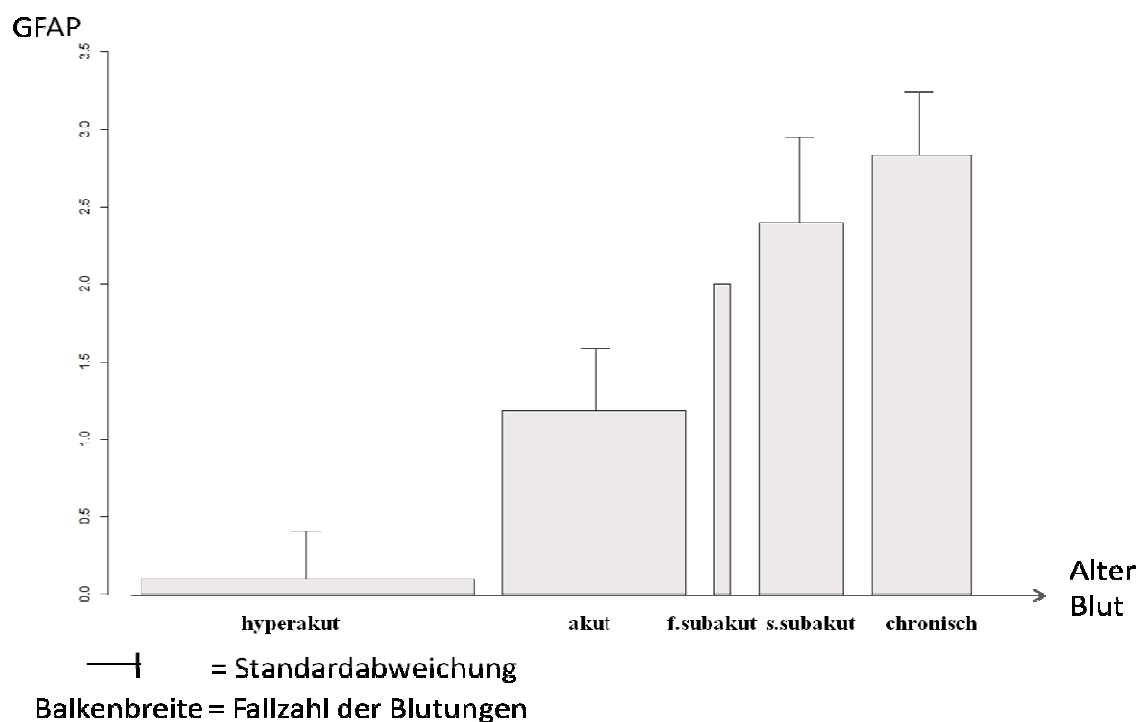
Makroskopisch war die mutmaßliche anatomische Lokalisation der Todesursache

- in 13 Fällen das Gehirn:
 - Schädelhirntrauma (SHT) (n=11), davon Stürze (n=7), Verkehrsunfälle (n=3) und Fall eines Fernseher auf den Kopf (n=1)
 - rupturiertes Hirnbasisaneurysma (n=1)
 - Hirnmassenblutung infolge Überdosierung von Marcumar (n=1)
- in 11 Fällen *nicht* das Gehirn:
 - Folgen einer Lungen- und / oder Herzerkrankung (n=6)
 - Sepsis / Multiorganversagen (n=2)
 - Polytrauma (n=2)
 - Messerstich (n=1)

4.2 Altersschätzung mittels GFAP- und Eisen-Färbung

In den 24 untersuchten Gehirnen wurden mittels der H.-E.-Färbung in 20 Gehirnen Blutungen festgestellt. Diese Blutungen wiesen unterschiedliche Größen (<1cm bis >4cm) auf und waren unterschiedlich alt (Minuten bis Jahre).

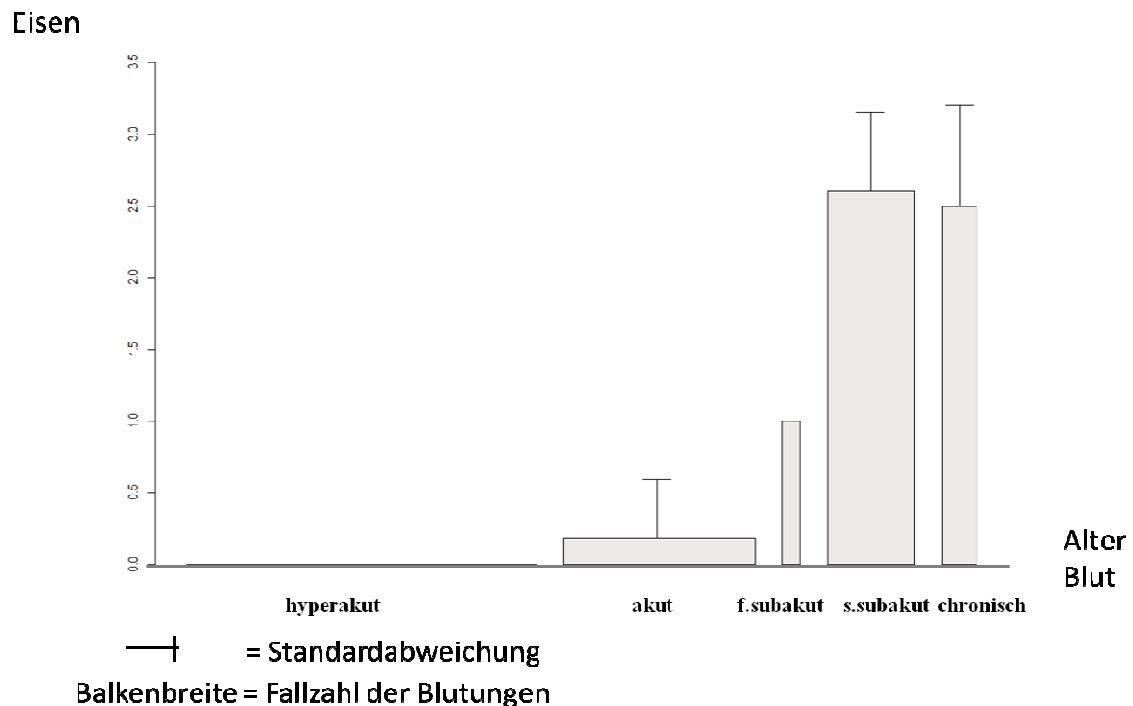
Sowohl in der GFAP- als auch in der Eisen-Färbung korrelierte der Grad der Anfärbbarkeit der Astrozyten bzw. der Siderophagen mit dem Blutungsalter. Dieser Zusammenhang ist unter Berücksichtigung der tatsächlichen Fallzahlen im Folgenden graphisch dargestellt (Graphik 1 und 2).



Graphik 1: Menge GFAP-gefärbter Astrozyten in Abhängigkeit vom Blutungsalter

In Graphik 1 ist einerseits die wachsende Menge GFAP-positiv gefärbter Astrozyten mit steigendem Blutungsalter ersichtlich, andererseits – repräsentiert durch die Dicke der Balken- der prozentuale Anteil der Hirne des jeweiligen Blutungsalters an der untersuchten Grundgesamtheit. Zu jedem Blutungsalter ist ferner die Standardabweichung über dem zugehörigen Balken angegeben. Da lediglich ein Gehirn

bzw. eine Blutung mit dem Alter von 5 Tagen in die Kategorie früh subakute Blutung fiel, ist hier eine Angabe der Standardabweichung nicht möglich.



Graphik 2: Menge der Eisenablagerungen in Abhängigkeit vom Blutungsalter

In Graphik 2 ist ebenso eine wachsende Menge von Eisenablagerungen mit steigendem Blutungsalter zu sehen. Der breiteste Balken, der die am häufigsten vorkommenden hyperakuten Blutungen repräsentiert, liegt in diesem Fall auf der x-Achse ohne Standardabweichung, da bei hyperakuten Blutungen (<24 Stunden) noch keine Eisenablagerungen zu finden waren.

Die nun folgenden Abbildungen sollen den bereits graphisch dargestellten Zusammenhang zwischen Blutungsalter und der Menge Eisen-/GFAP-positiver Zellen anhand von vier Beispielen verschieden alter Blutungen (zwischen 10 Stunden und ca. einem Jahr) bildlich darstellen. Zu sehen ist jeweils der makropathologische Bildausschnitt sowie die zugehörige H.-E.-, Eisen- und GFAP-Färbung (Abb. 5, 6, 7

und 8). Abbildung 9 zeigt zwei Beispiele sehr alter ischämischer Hirninfarkte ohne Einblutung mit deutlicher Glianarbe, jeweils in H.-E.-, Eisen- und GFAP-Färbung (Abb.9).

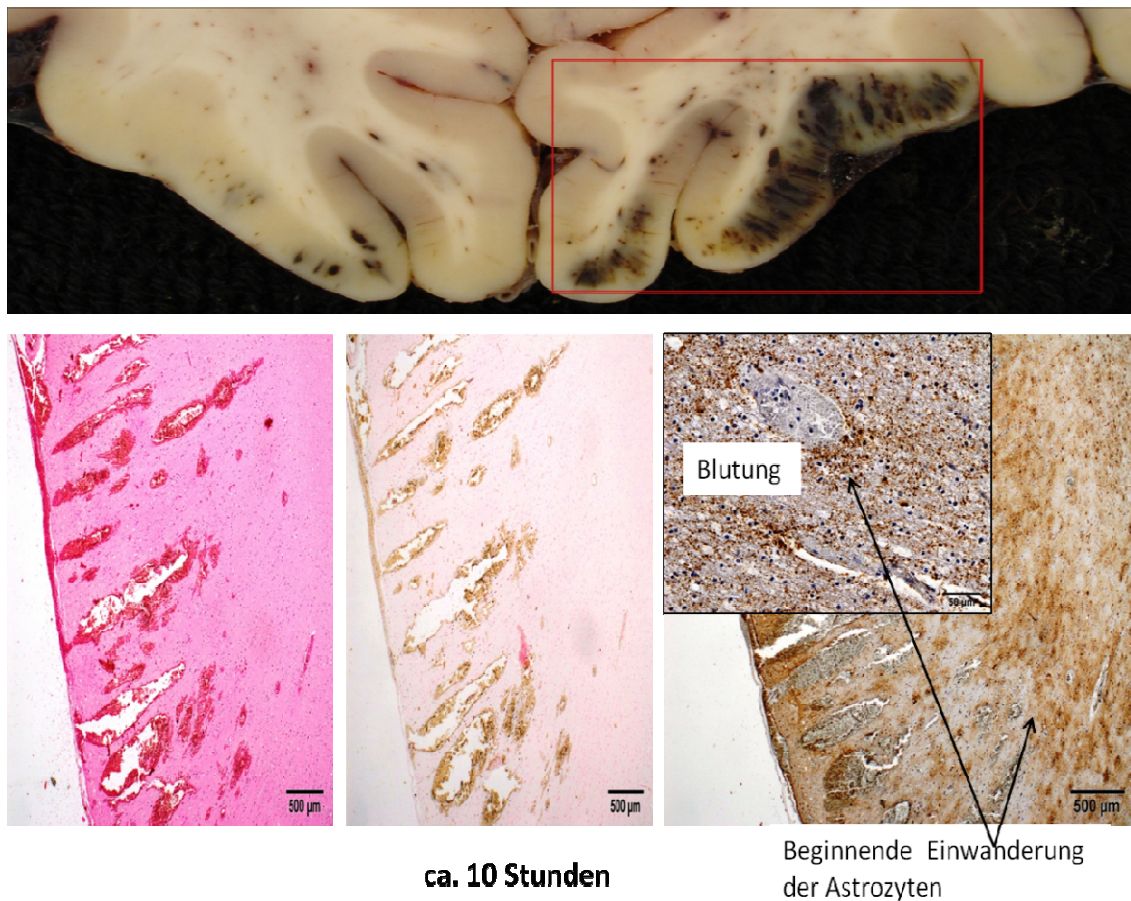
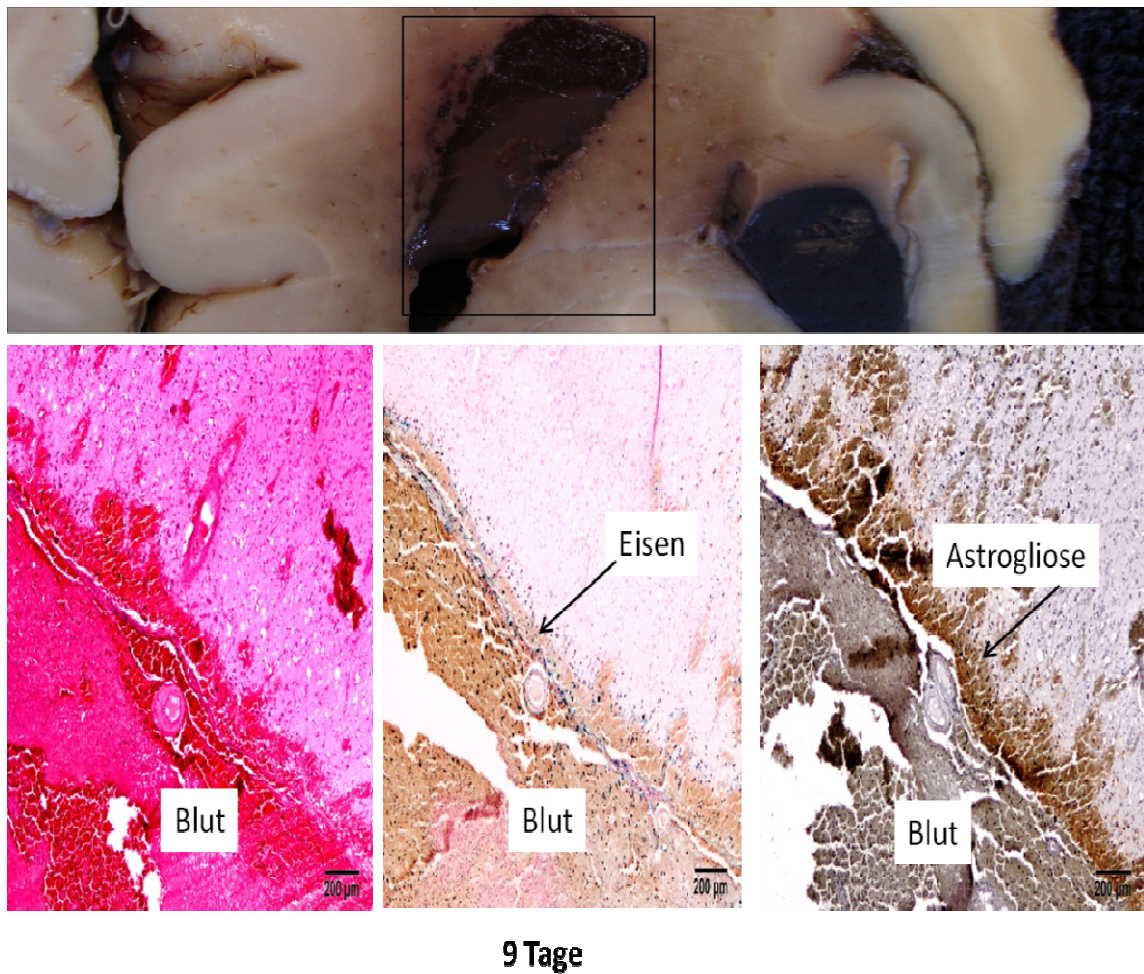


Abbildung 5: Beispiel etwa 10 Stunden alter Kontusionsblutungen nach Verkehrsunfall; oben makropathologischer Bildausschnitt, unten links H.-E.-Färbung, mittig Eisen-Färbung, rechts zweimal GFAP-Färbung; 3x in 20facher und 1x in 200facher Vergrößerung

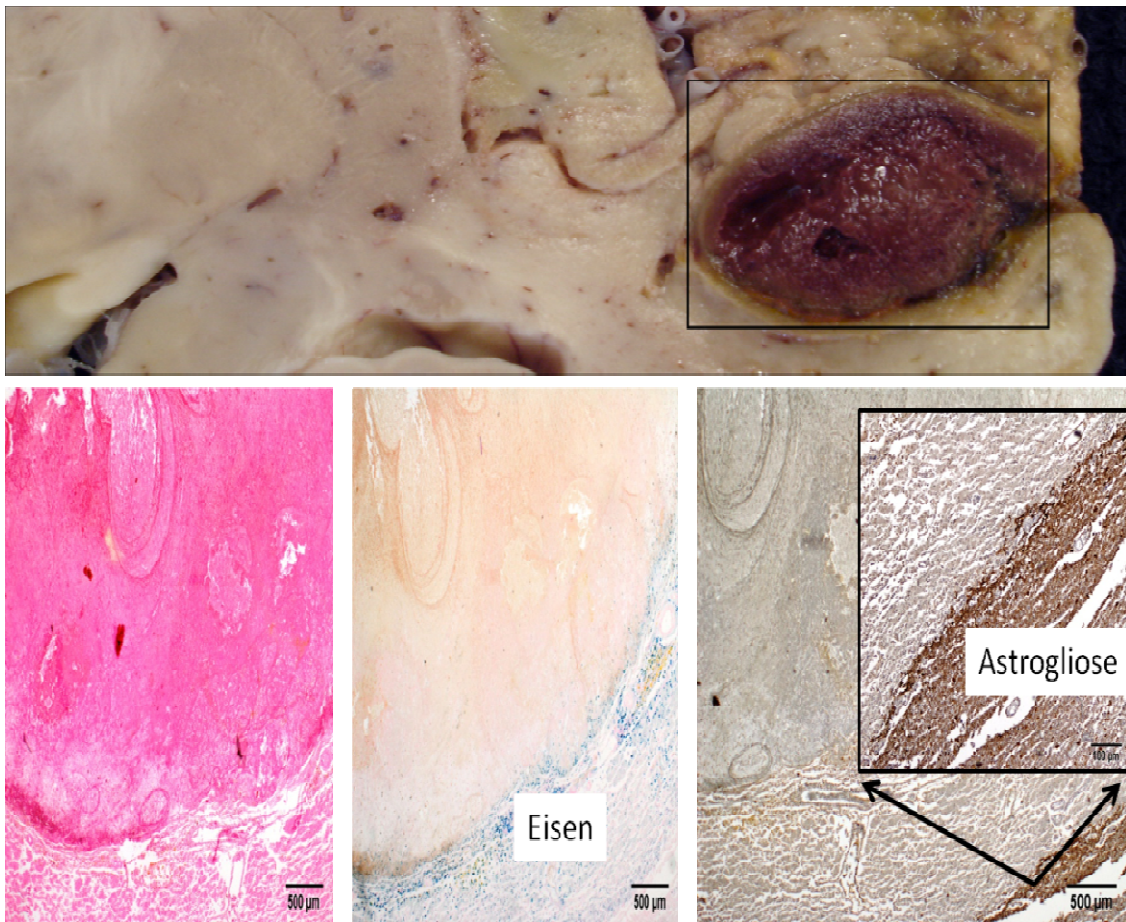
Abbildung 5 zeigt frische Kontusionsblutungen nach einem Schädel-Hirntrauma infolge eines Verkehrsunfalls. In der Eisenfärbung (mittig) sind noch keine Eisenpigmente sichtbar. Die GFAP-Färbung zeigt in der Übersicht wie auch in der Vergrößerung neben bläulich-türkis angefärbtem Blut eine beginnende Einwanderung der braun gefärbten Astrozyten in die unmittelbare Umgebung der Blutungen.



9 Tage

Abbildung 6: Beispiel einer 9 Tage alten Blutung nach Sturz; oben makropathologischer Bildausschnitt, unten links H.-E.-Färbung, mittig Eisen-Färbung, rechts GFAP-Färbung; jeweils in 40facher Vergrößerung

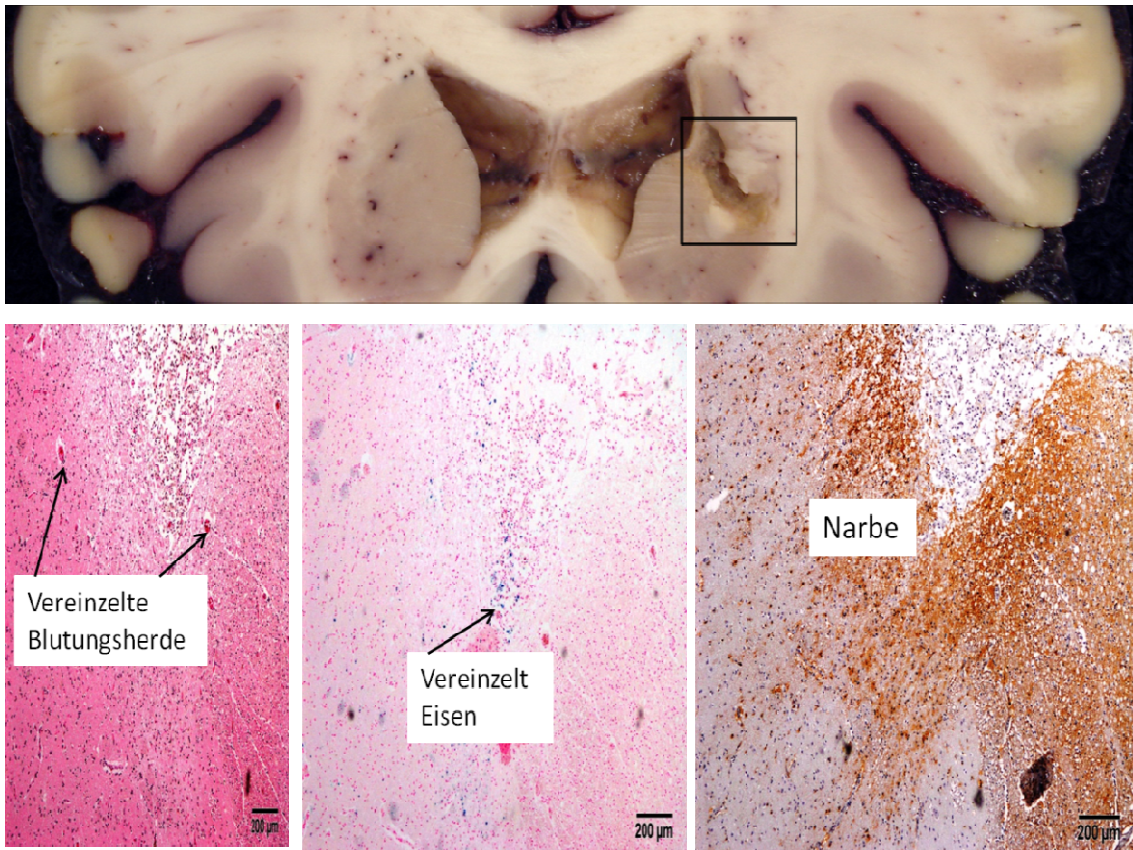
Abbildung 6 zeigt eine 9 Tage alte traumatische Blutung des Frontallappens. In der Eisenfärbung (mittig) ist angrenzend an die Blutung ein schmales Band blau gefärbter Siderophagen sichtbar. Die GFAP-Färbung (rechts) zeigt angrenzend an die von der Färbung teils ausgewaschenen Blutung (linker Bildrand) ein schmales Band braun gefärbter eingewanderter Astrozyten.



ca. 4 Wochen

Abbildung 7: Beispiel eines ca. vier Wochen alten Infarktes mit großer Einblutung; oben makropathologischer Bildausschnitt, unten links H.-E.-Färbung, mittig Eisen-Färbung, rechts GFAP-Färbung; 3x in 40facher und 1x100facher Vergrößerung

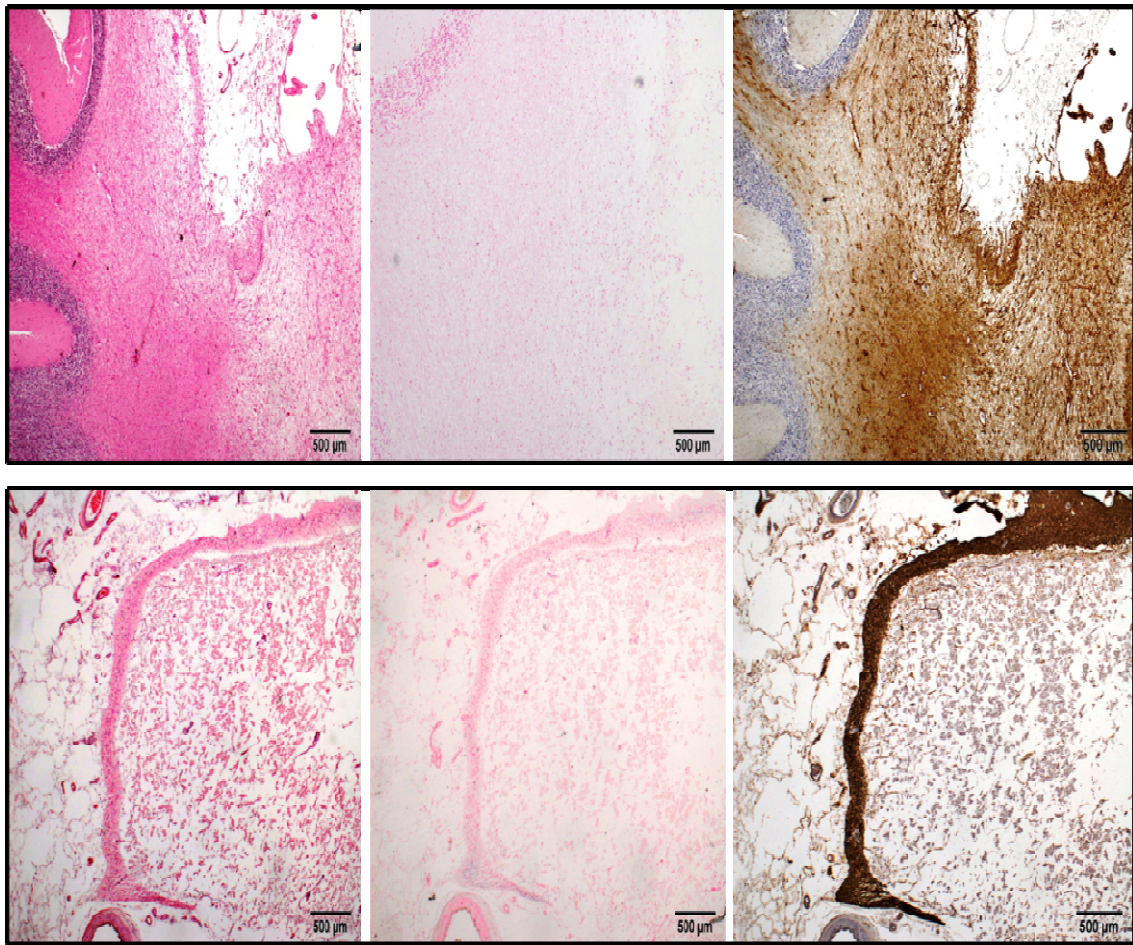
Abbildung 7 zeigt einen ca. 4 Wochen alten Hirninfarkt mit großer Einblutung an der Grenze zwischen Parietal- und Temporallappen. Gut sichtbar sind neben der großen Blutung die dichten Eisen-Ablagerungen sowie die breite bandförmige Astrogliose um den Blutungsherd. Diese ist durch den vergrößerten Bildausschnitt hervorgehoben.



ca. 1 Jahr

Abbildung 8: Beispiel eines alten Infarkts in den Basalganglien mit kleinen Restblutungen; oben makropathologischer Bildausschnitt, unten links H.-E.-Färbung, mittig Eisen-Färbung, rechts GFAP-Färbung; jeweils in 40facher Vergrößerung

Abbildung 8 zeigt einen ca. ein Jahr alten Hirninfarkt der Basalganglien links mit kleinen, nicht abgeräumten Restblutungen, die lediglich in der H.-E.- Färbung sichtbar sind (Markierung H.-E.-Färbung links). In der Eisenfärbung (mittig) sind nur noch vereinzelte blaue Eisenablagerungen zu sehen. Die GFAP-Färbung zeigt eine breite Narbe, die das durch den Hirninfarkt untergegangene Gewebe am oberen Bildrand von dem intakten Hirngewebe im linken unteren Bildrand abgrenzt.

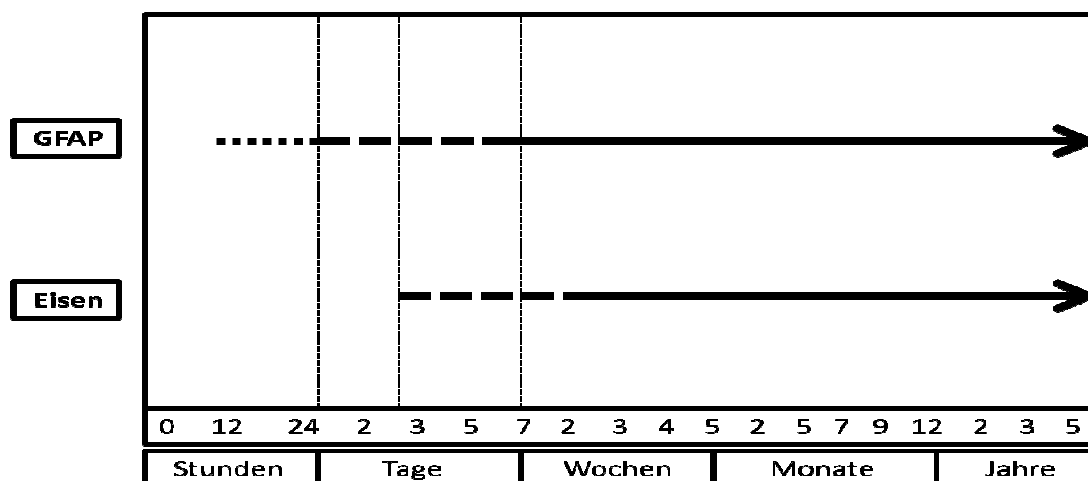


2 alte ischämische Infarkte (ohne Einblutung)

Abbildung 9: Zwei Beispiele ischämischer Hirninfarkte; oben Kleinhirninfarkt, unten Infarkt im Parietallappen; jeweils links H.-E., mittig Eisen-, rechts GFAP-Färbung; alle Bilder in 20facher Vergrößerung

Abbildung 9 zeigt zwei Beispiele von ischämischen Hirninfarkten ohne Einblutung. Die obere Serie zeigt einen Kleinhirninfarkt, die untere einen Infarkt im Parietallappen. In beiden ist bereits in der H.-E.-Färbung die persistierende Glianarbe deutlich zu erkennen. In beiden Eisenfärbungen sind aufgrund der fehlenden Einblutung keine Eisenablagerungen zu sehen.

In Graphik 3 sind abschließend die wachsende Zahl der GFAP-/ Eisenablagerungen in Abhängigkeit vom Blutungsalter schematisch dargestellt.



Graphik 3: GFAP/Eisen-Nachweis in Abhängigkeit des Blutungsalters, modifiziert nach Hausmann 2006

4.3 Aussagekraft der MRT

Die Befunde der H.-E.-Färbung stellten den Goldstandard dar. Im Folgenden wird das Maß der Übereinstimmung bei der Diagnostik von intrazerebralen Blutungen zwischen der histologischen Befunderhebung und der MRT-Befunderhebung für alle untersuchten Gehirne (n=24) dargestellt.

4.3.1 Gehirnzählung

Von den sieben untersuchten Hirninfarkten mit makroskopisch gesichteter Einblutung konnten mittels der H.-E.-Färbung dreimal eine Einblutung bestätigt werden. Bei den restlichen vier Hirninfarkten handelte es sich histologisch um sog. ischämische Hirninfarkte ohne sekundäre Einblutung, so dass insgesamt n=20 Gehirne Blutungen aufwiesen. Von diesen konnten in der verblindeten Begutachtung mittels der MRT n=15

bestätigt werden. Hierbei handelte es sich sowohl um große ($> 3,6\text{cm}$) als auch um sehr kleine ($<1\text{cm}$) Blutungen (Abb.10 und 11).

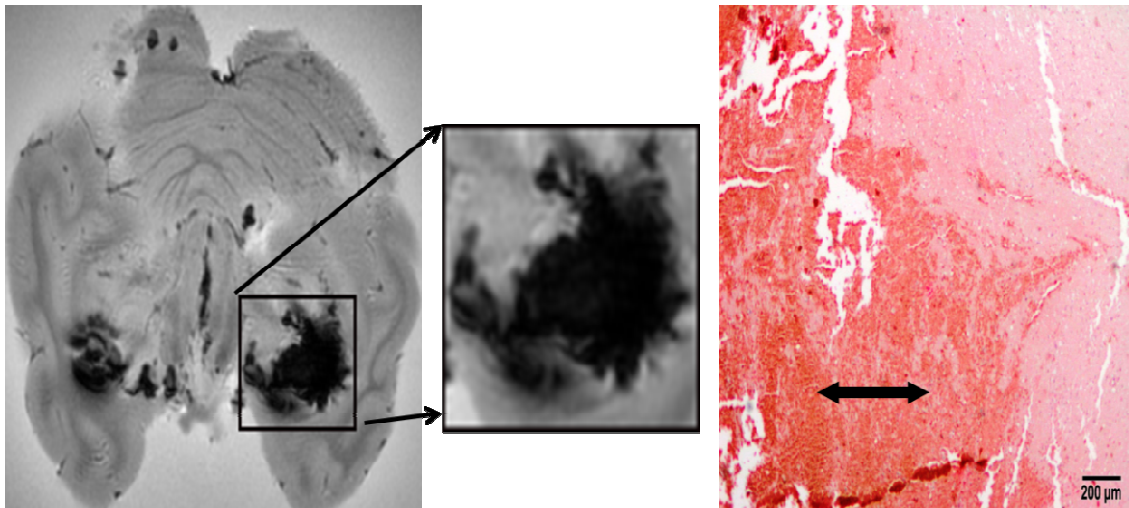


Abbildung 10: Beispiel einer großen einen Tag alten Blutung im Temporallappen, links und mittig T2*-gewichtete MRT-Bilder in transversaler Ebene; rechts H.-E.-Färbung in 40-facher Vergrößerung mit Doppelpfeil im Blutungsareal

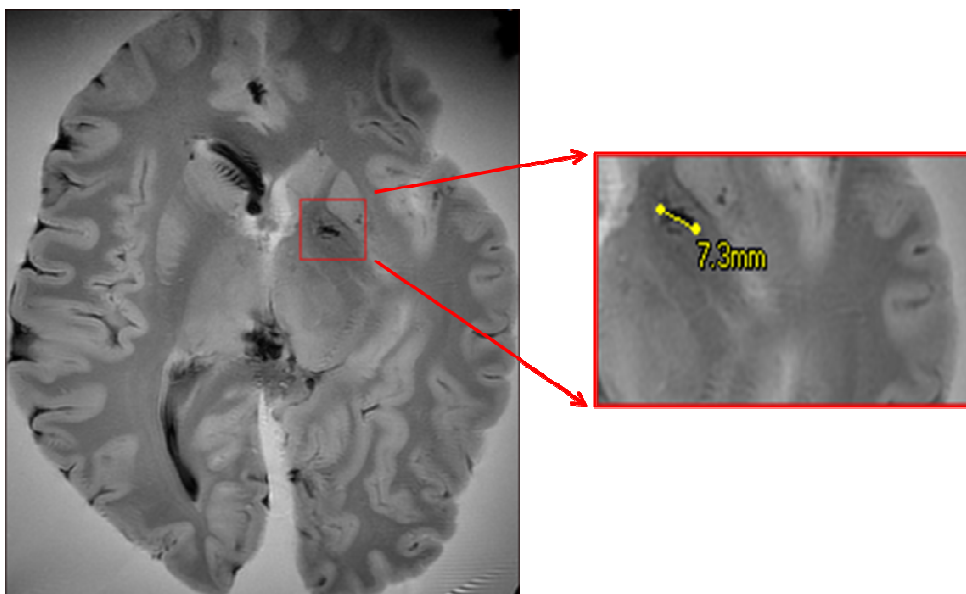


Abbildung 11: T2*-gewichtetes MRT-Bild einer nachgewiesenen Mikroblutung in den Basalganglien, rechts in Vergrößerung mit Größenmessung

Insgesamt ergab sich für das Erkennen von intrazerebralen Blutungen (n=20 Gehirne) mittels der MRT eine Sensitivität von 75% (UKI 53%, OKI 89%), eine Spezifität von 100% und ein Anteil an falsch positiven Gehirnen von 0%.

In der unverblindeten Begutachtung wurden in 18 von 20 Gehirnen intrazerebrale Blutungen mittels der MRT erkannt. Dies ergab eine Sensitivität von 90% (UKI 69%, OKI 98%), eine Spezifität von 100% und einen Anteil an falsch positiven Gehirnen von 0%. Auch die Negativkontrolle (ein befundfreies Gehirn) wurde als solche erkannt.

4.3.2 Befundzählung

26 von 33 intrazerebralen Blutungen konnten in der verblindeten Begutachtung mittels der MRT bestätigt werden. Die MRT erbrachte keine falsch positiven Befunde. Dies ergab für die MRT-Untersuchung eine Sensitivität von 79% (UKI 62%, OKI 90%) und einen positiv prädiktiven Wert von 100%.

In der unverblindeten Untersuchung wurden 31 von 33 intrazerebralen Blutungen erkannt. Hier zeigte sich eine Sensitivität von 94% (UKI 79%, OKI 99%), ein positiv prädiktiver Wert von 100% und ein Anteil falsch positiver Befunde von 0%.

Im Einzelnen wurden dabei alle Blutungen im Thalamus (n=2), Hypothalamus (n=2), Kleinhirn (n=3), Mesencephalon (n=1), Corpus callosum (n=2) und im Occipital- (n=2) sowie Frontallappen (n=9) detektiert. In der verblindeten MRT-Begutachtung wurden sieben Blutungen nicht erkannt. Diese befanden sich im Hippocampus (n=1), der Pons (n=2), in den Basalganglien (n=2) und im Temporal- (n=1) sowie Parietallappen (n=1).

In der unverblindeten MRT-Begutachtung konnten 2 Blutungen nicht bestätigt werden. Diese befanden sich im Hippocampus und in den Basalganglien. Bei den falsch

negativen Befunden bzw. mittels der MRT nicht erkannten Blutungen handelte es sich mit einer Ausnahme um kleine ($<2\text{cm}$) und sehr kleine ($<1\text{cm}$) Blutungsherde.

Bei einer sowohl verblindet als auch unverblindet mittels MRT nicht detektierten sehr kleinen Blutung handelte es sich um einen alten Hirninfarkt in den Basalganglien mit Einblutung, der Infarkt konnte mittels der MRT bestätigt werden, die histologisch nachgewiesene Einblutung nicht (Abb.12).

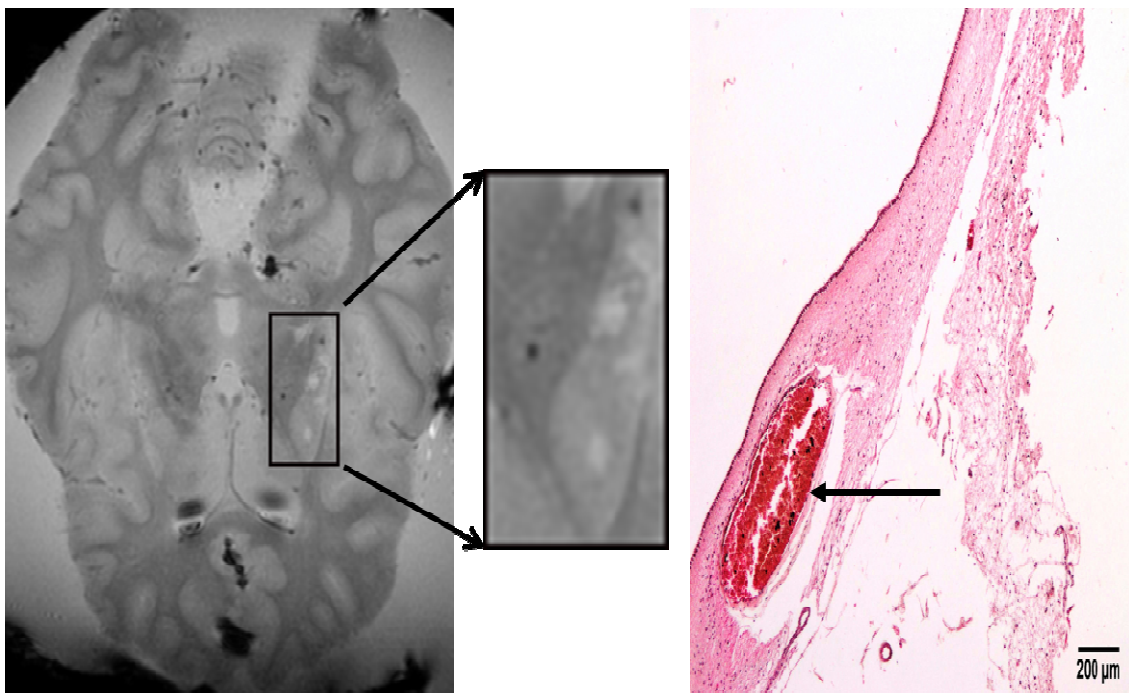
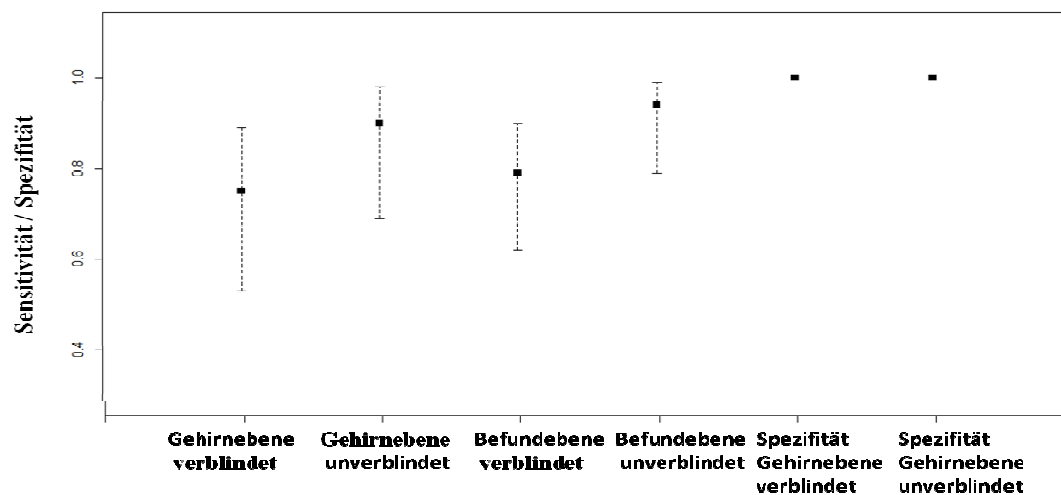


Abbildung 12: alter Infarkt in den Basalganglien, links T2*-gewichtetes MRT-Bild mit zugehöriger Vergrößerung in transversaler Ebene ohne Blutungsnachweis; rechts Nachweis von Blut an der selben Lokalisation, H.-E.-gefärbt in 40-facher Vergrößerung, die Pfeilspitze deutet auf das Blutungsareal

Graphik 4 zeigt eine Zusammenfassung der Gütemaße Sensitivität und Spezifität für die magnetresonanztomographische Befunderhebung in verblindeter und unverblindeter Begutachtung mit den jeweils zugehörigen Konfidenzintervallen.



Graphik 4: Gütemaße Sensitivität und Spezifität mit den zugehörigen Konfidenzintervallen; oberes Konfidenzintervall (OKI) oberhalb, unteres Konfidenzintervall (UKI) unterhalb des punktförmig markierten Gütemaßes

In Graphik 4 ersichtlich ist die höchste Sensitivität für die unverblindete Befunderhebung (Gehirn- wie Befundebene) und eine Spezifität von 100% in der verblindeten wie unverblindeten Begutachtung. Die jeweils oberen und unteren Konfidenzintervalle (OKI/ UKI) sind vertikal durch gestrichelte Linien dargestellt. Sie fehlen bei der ermittelten Spezifität aufgrund von fehlenden falsch negativen Befunden (3.4). Die Spezifität ist nur auf der Gehirnebene jeweils in verblindeter und unverblindeter Begutachtung angegeben. Ihre Berechnung ist auf Befundebene aufgrund von fehlenden richtig negativen Befunden nicht möglich (3.4.2).

4.3.3 Ermittlung von Suszeptibilitätsartefakten

Die MRT erbrachte in der verblindeten und unverblindeten Begutachtung keine falsch positiven Befunde. In keinem Fall wurden eventuell vorhandene Luft- bzw. Suszeptibilitätsartefakte fälschlicherweise für Blut gehalten. In Fällen bei denen eine Unterscheidung zwischen Artefakt (Luft) und Blut in den T2*-gewichteten Sequenzen schwerfiel, konnten Unsicherheiten mithilfe der zusätzlich vorliegenden T1-gewichteten *3D-fast-spoiled-gradient-echo*-(FSPGR,3D)- und protonendichte-gewichteten *Fast-spin-echo*-(FSE-XL)- Sequenzen behoben werden. In diesen sind Luftartefakte schwarz dargestellt und folglich leicht von Gewebsdefekten (heller kontrastiert) wie Blut zu unterscheiden (Abb.13).

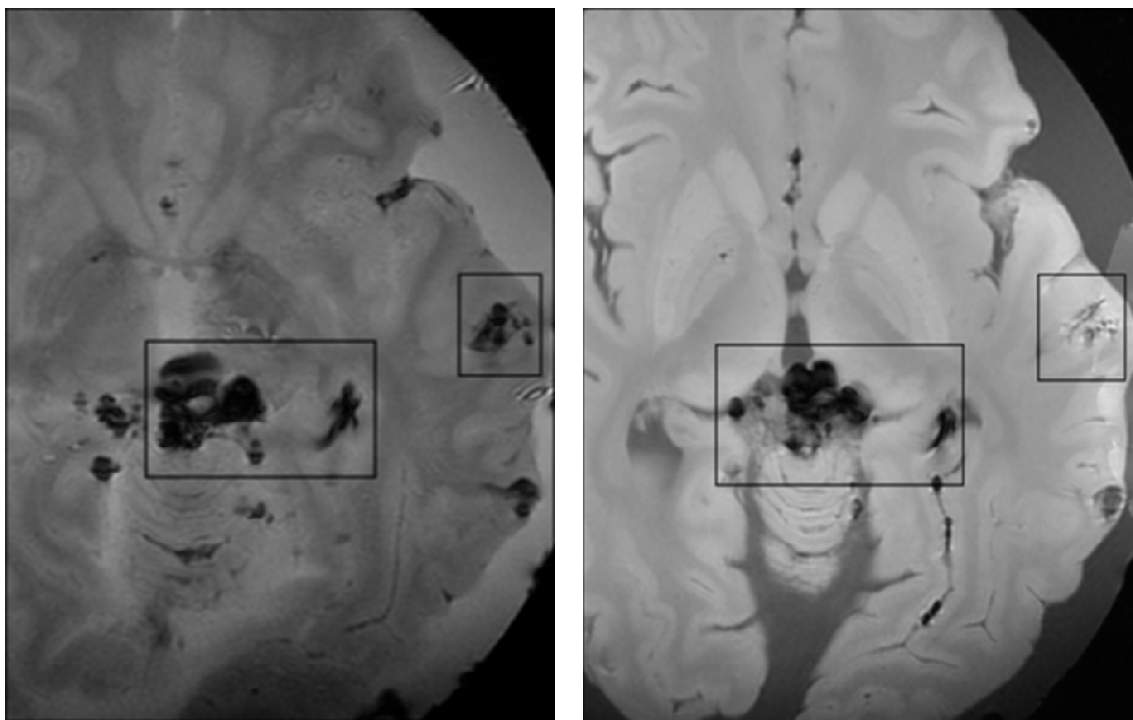


Abbildung 13: Unterscheidung von Luftartefakten und Blut. Links T2*-gewichtetes MRT-Bild ohne Unterschied in der Signalintensität, rechts T1-gewichtetes MRT-Bild mit schwarzer Luft und deutlich heller kontrastiertem Defekt im Temporallappen

4.4 Altersschätzung mittels postmortaler MRT

Es konnte gezeigt werden, dass die MRT mithilfe der T2*-gewichteten (GE)-Sequenz eine sensitive Methode zur Diagnostik von intrazerebralen Blutungen unterschiedlichen Alters (Minuten bis Jahre) darstellt. Es war jedoch mittels der MRT kein Zusammenhang zwischen der Signalintensität und dem jeweiligen Blutungsalter ersichtlich. Zwar zeigten sich in jedem Alter unterschiedliche Signalintensitäten, von homogen hypointens bis inhomogen mit hypo-, iso- und hyperintensiven Arealen, jedoch waren diese Signalveränderungen weder größen- noch altersspezifisch. Folglich konnte kein für das jeweilige Alter der intrazerebralen Blutungen spezifisches Signalverhalten detektiert werden (Abb.13, 14 und 15).

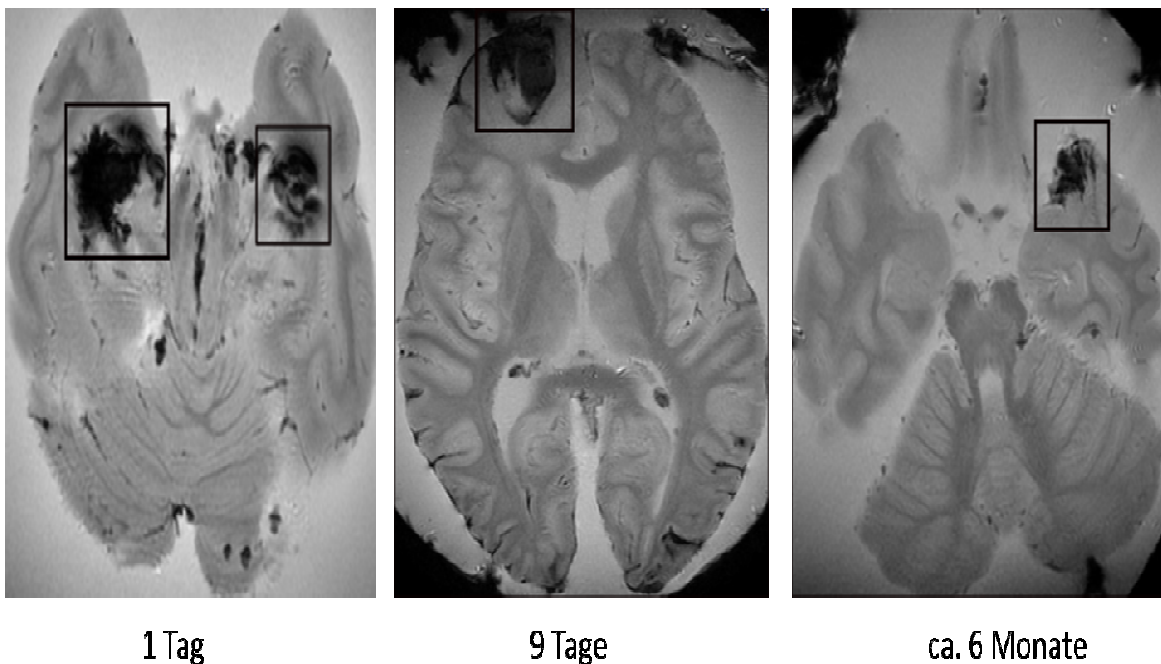


Abbildung 13: *Drei Beispiele verschieden alter größerer Blutungen in T2*-gewichteter Sequenz mit annähernd gleicher Signalintensität (homogen hypointens)*

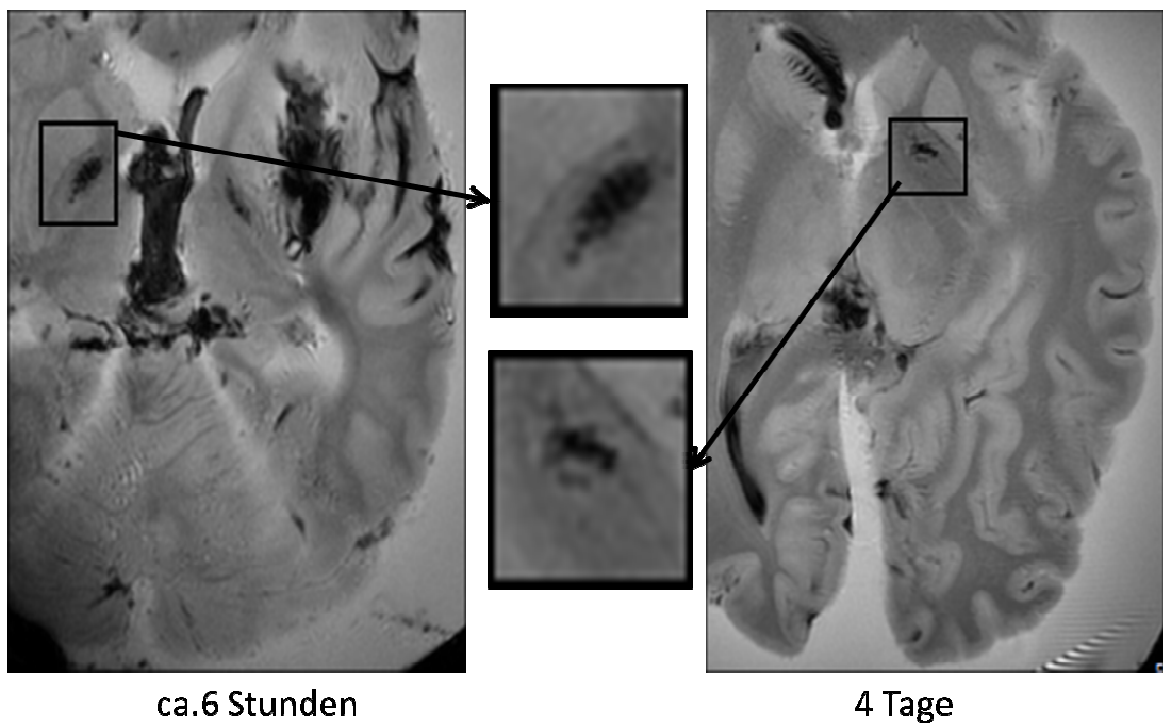


Abbildung 14: zwei Beispiele verschieden alter kleiner Blutungen in den Basalganglien in T2*-gewichteter Sequenz mit gleicher Signalintensität (homogen hypointens)

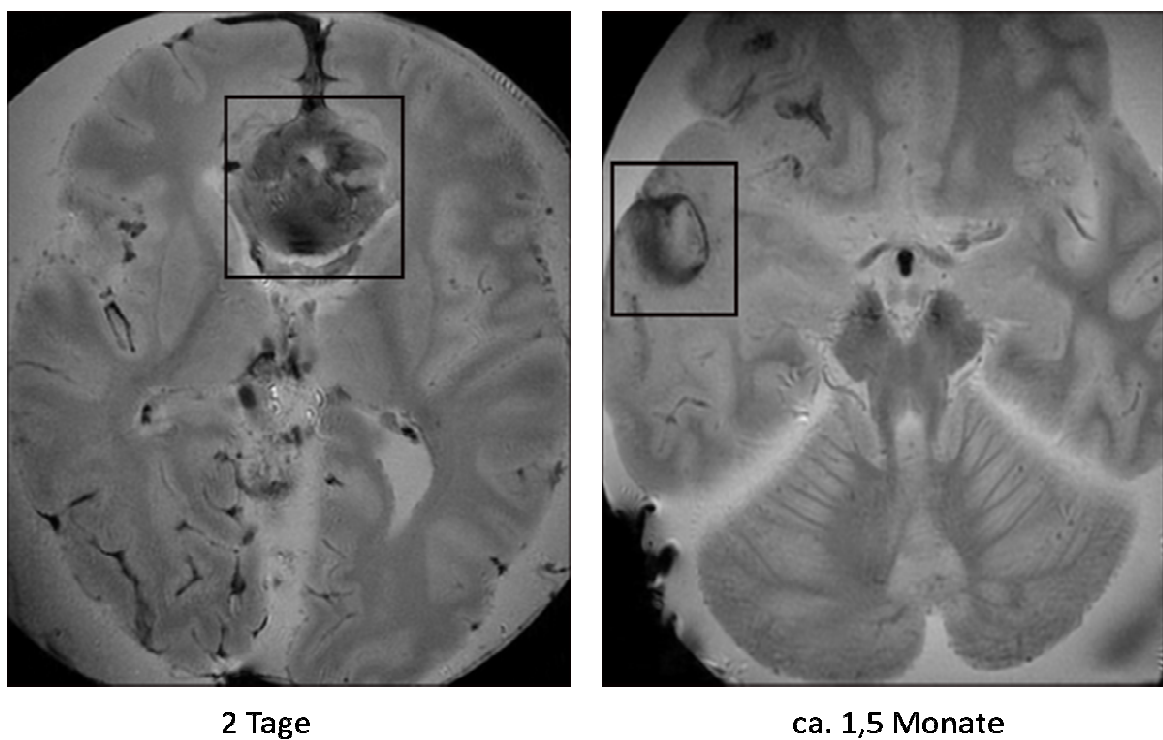





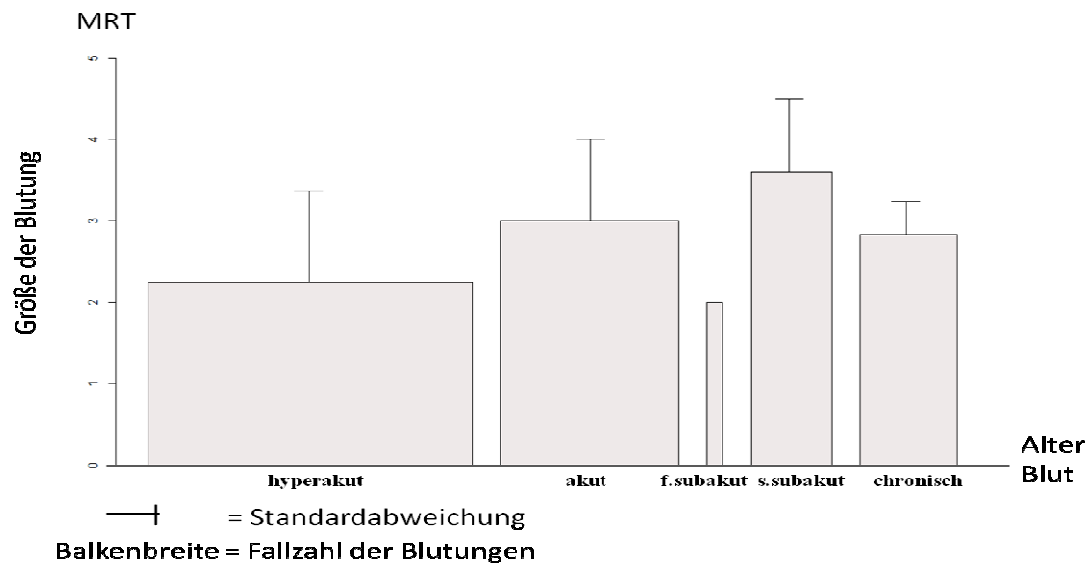
Abbildung 15: zwei Beispiele verschieden alter großer Blutungen in T2*-gewichteter Sequenz mit annähernd gleicher Signalintensität (inhomogen), links in transversaler rechts in koronarer Schnittebene

Tabelle 4 fasst die drei häufigsten Signalveränderungen in Abhängigkeit von deren Größe und deren Blutungsalter zusammen. Aus ihr ist ersichtlich, dass das jeweilige Signalverhalten der intrazerebralen Blutungen weder größen- noch altersspezifisch war.

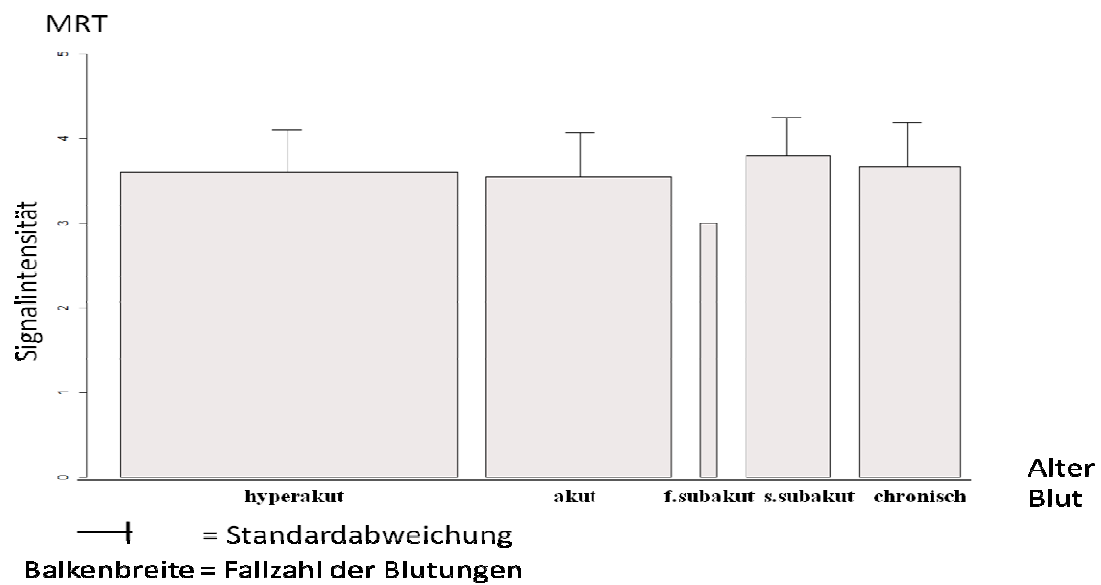
Tabelle 4: Darstellung der drei häufigsten Signalintensitäten in Abhängigkeit von Größe und Alter der Blutungen, der Übersicht halber vereinfacht in Kreisform dargestellt, modifiziert nach Ripoll et al. 2004

Signalintensität	Zahl in %	Größe	Alter
homogen hypointens 	ca. 25%	jede Größe	Jedes Alter
inhomogen mit isointens 	ca. 40 %	jede Größe	Jedes Alter
inhomogen mit hyperintens 	ca. 30%.	mittlere bis große Blutungen	Jedes Alter

Die folgenden Graphiken verdeutlichen unter Berücksichtigung der tatsächlichen Fallzahlen den Zusammenhang zwischen Blutungsgröße und Blutungsalter (Graphik 5) bzw. Signalintensität und Blutungsalter (Graphik 6). Weder die Größe noch das Signalverhalten der Blutungen konnte mit dem jeweiligen Alter in Zusammenhang gebracht werden.



Graphik 5: Blutungsgrößen in Abhängigkeit vom Blutungsalter



Graphik 6: Signalintensitäten in Abhängigkeit vom Blutungsalter

4.5 Korrelationskoeffizienten der Altersschätzungen

Tabelle 5 zeigt die Koeffizienten der Korrelation zwischen dem tatsächlichen Blutungsalter und der Altersschätzung der jeweiligen Blutungen anhand der histologischen Eisen- und GFAP-Färbung sowie der mittels der MRT berechneten Bezüge Signalintensität und Größe. Es zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge ($p < 0,001$) zwischen der Menge Eisen-/GFAP-positiver Zellen und dem Blutungsalter. Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Blutungsalter und der jeweiligen Signalintensität oder Größe der Blutung im MRT-Bild detektiert. Entsprechend erscheint eine Altersschätzung mithilfe dieser Messgrößen als nicht möglich.

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten nach Kendall zwischen dem tatsächlichen Blutungsalter und der Altersbestimmung mittels der Eisen-/GFAP-Färbung sowie mittels der MRT

	Alter
Eisen	0,60*
GFAP	0,91*
MRT Signalintensität	0,30 ^{ns}
MRT Größe	0,27 ^{ns}

* = $p \leq 0,001$

ns = nicht signifikant

4.6 Formalinpigmente in den histologischen Präparaten

Bei der Begutachtung der histologischen Präparate fiel bei ca. der Hälfte (n=54) der Präparate (gesamt n=117) kleine schwarze Fixationsartefakte in Form von Formalinpigmenten auf. Diese waren überwiegend innerhalb der Blutungen zu finden. Sie beeinträchtigten aufgrund ihrer unterschiedlichen Lage, Größe und Farbe zu den interessierenden Strukturen in keinem Fall die lichtmikroskopische Auswertung der GFAP- und Eisenfärbungen (Abb.16).

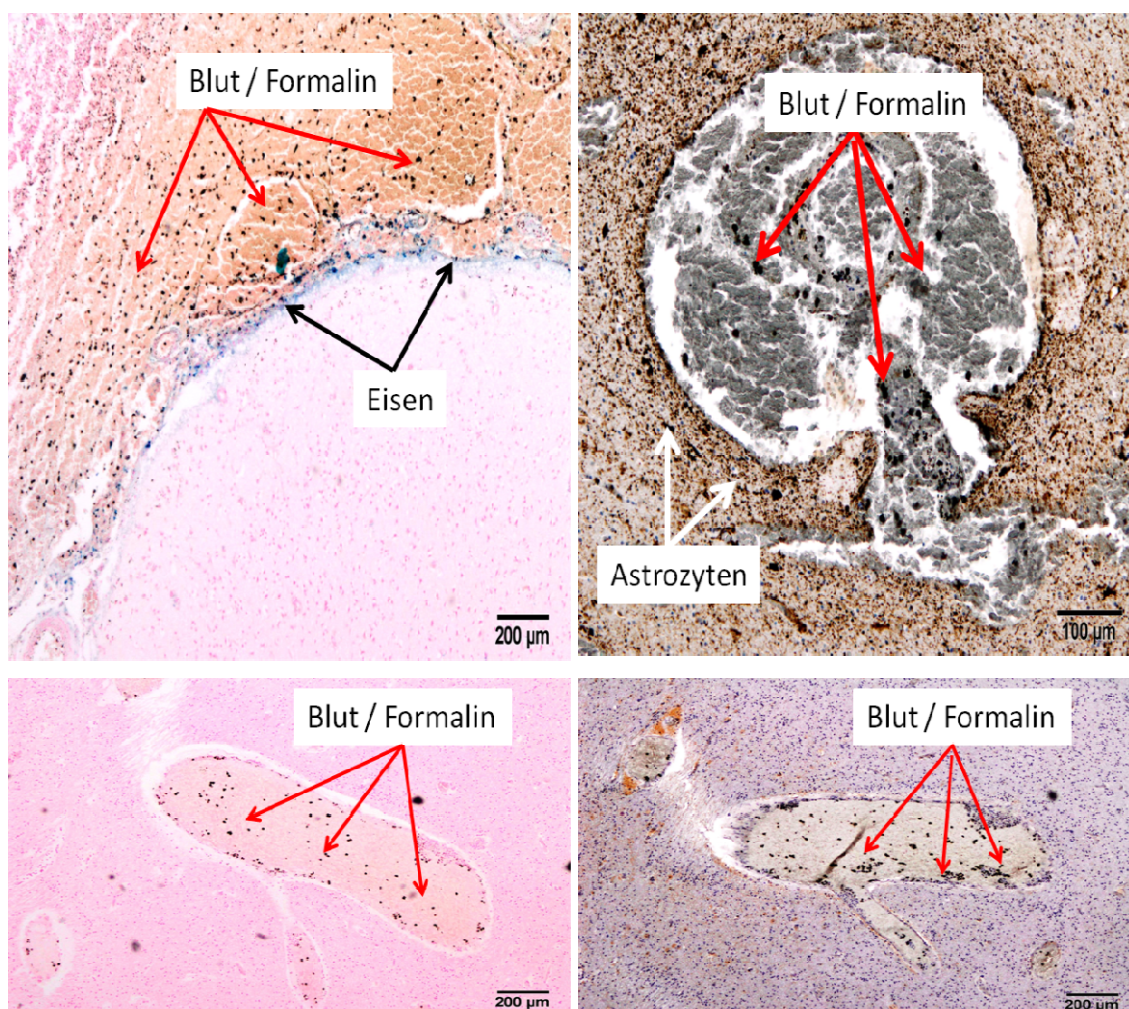


Abbildung 16: 4 Beispiele für schwarze Formalinpigmente innerhalb von Blutungen, markiert durch rote Pfeile; links Eisen-Färbung, rechts GFAP-Färbung; jeweils in 100facher Vergrößerung

5. Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse, das Studiendesign sowie der Einfluss von Formalin auf die MRT und die Histologie diskutiert.

5.1 Ergebnisdiskussion

5.1.1 Altersschätzung intrazerebraler Blutungen mittels GFAP-Färbung

Studien zur Wundaltersbestimmung bei Kontusionen zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl GFAP-positiver, reaktiver Astrozyten im posttraumatischen Intervall zwischen einem Tag und vier Wochen nahe der Läsion (Betz und Hausmann 2007, Hausmann 2006, Hausmann et al. 2000, Mackenzie und Clayton 1999). Dabei sinkt mit zunehmender Entfernung von der Läsion die Anzahl GFAP-positiver Astrozyten (Li et al. 2010).

Diese Ergebnisse konnte die vorliegende Arbeit weitgehend bestätigen. Allerdings fiel die Dichte GFAP-positiver Astrozyten bei alten Läsionen nicht wie erwartet ab, sondern zeigte in Form von Narben persistierend hohe Werte. Dieses Ergebnis könnte in der Art der alten Läsionen begründet sein. Bei diesen (n=6) handelte es sich in vier Fällen um alte ischämische Infarkte. Auch ischämische Infarkte rufen neben dem Untergang von Nervenzellen eine reaktive Astroglie um den Infarktbezirk hervor (Silver und Miller 2004, Stoll et al. 1998). Diese Reaktion dient einerseits dem Schutz der noch intakten Nervenzellen vor Hypoxie und unkontrolliertem Gewebsuntergang (Nakaze et al. 2004), andererseits hindert der gebildete Astrozytenwall die Nervenzellen an der Regeneration (Silver und Miller 2004). Hierfür produzieren die reaktiven Astrozyten – anders als bei Blutungen - eine dauerhafte Narbe um den Infarktbezirk (Nedergaard und Dirnagl 2005, Stewart et al. 2004, Stoll et al. 1998), einhergehend mit einer bleibenden Atrophie des

verletzten Gewebes innerhalb der Glianarbe (Stewart et al. 2004). Dies könnte die persistierend hohen GFAP- Werte der alten Läsionen in der vorliegenden Arbeit erklären.

Ekmark-Lewén et al. (2010) untersuchten in einer experimentellen Studie zu traumatischen Hirnrindenverletzungen neben GFAP auch das Protein Vimentin als weiteren Marker reaktiver Astroglie. Die Immunreaktivität von Vimentin, welche in gesundem Hirngewebe der Maus nicht nachweisbar ist, war in einem Zeitintervall von 24 Stunden bis zu drei Wochen deutlich sensitiver nachweisbar als jene von GFAP. Betz und Hausmann (2007) fanden in menschlichen Gehirnen eine regelmäßige Nachweisbarkeit von Vimentin im Zeitintervall zwischen fünf Tagen und vier Wochen. Es erfordert jedoch weitere Untersuchungen ob Vimentin im menschlichen Gehirn auch als deutlich sensitiverer Marker im Vergleich zu GFAP für die Altersschätzung von intrazerebralen Blutungen genutzt werden kann.

5.1.2 Altersschätzung intrazerebraler Blutungen mittels Eisen-Färbung

Um eine positive Eisen-Färbereaktion zu gewährleisten, sollte das postmortem-Intervall (Zeit zwischen Eintritt des Todes und Gewebefixierung) möglichst kurz gehalten werden. Eisen verlässt bei Autolyse frühzeitig die Zellen und ist kurz danach mittels histochemischer Methoden deutlich schlechter nachweisbar (Lang 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde in keinem Fall ein postmortem-Intervall von 4 Tagen überschritten.

Wie auch in den Untersuchungen von Jakob (2007) und Oehmichen et al. (2003) korrelierte der Grad der eisenspeichernden Siderophagen in der hier vorliegenden Arbeit mit dem Alter der Blutungen. Oben genannte Autoren zeigten eine positive Färbereaktion erstmals nach 3 Tagen, wobei auch in den Fällen mit einer Überlebenszeit

>1 Jahr noch vereinzelt der Nachweis von Siderophagen gelang. Loberg und Torvik (1989) hingegen fanden diesen Zelltyp erstmals bereits 48 Stunden nach Traumatisierung. Diese Ergebnisse stützen das Postulat von Oehmichen et al. (1981), wonach der Abbau von Hämoglobin zu Hämosiderin mindestens 10 Stunden erfordert und folglich früher keine positive Färberaktion zu erwarten ist.

5.1.3 Aussagekraft der MRT bei der Diagnostik intrazerebraler Blutungen

In der vorliegenden Arbeit war bereits bei der verblindeten Untersuchung die Beurteilung von intrazerebralen Blutungen mittels der 3-Tesla-MRT (Gehirnzählung: Sensitivität 75%, Spezifität 100%; Befundzählung: Sensitivität 79%) zuverlässiger als jene von Yen et al. (2007) (Sensitivität 63%), die unter Verwendung der 1,5-Tesla-MRT postmortal Gehirne in-situ untersuchten.

Auch die meisten Mikroblutungen (n=4) von weniger als einem cm Größe konnten bereits während der verblindeten Befunderhebung bestätigt werden (4.2.1, Abb.5). Dies gleicht den Beobachtungen von Nighoghossian et al. (2002) und Ripoll et al. (2003 und 2002), die mittels der 0,5T- und 1,5T-MRT unter Verwendung der GE-Sequenz Mikroblutungen in vivo nachweisen konnten. In Studien von Jones et al. (1998) hingegen, die unter Verwendung der Spin-Echo-(SE)-Sequenz bei 1 Tesla Feldstärke postmortal Gehirne nach Schädel-Hirn-Trauma untersuchten, erbrachte die MRT bei der Diagnostik von Mikroblutungen (<8mm) in über 75% falsch negative Befunde. Es kann also festgehalten werden, dass in der postmortalen Bildgebung die Verwendung der GE-Sequenz bei 3 Tesla Feldstärke für das Erkennen von bereits kleinsten Blutungsherden eine sensitive Methode ist.

Allerdings muss der fehlende Anteil falsch positiver Befunde (Spezifität von 100%) der hier vorliegenden Arbeit kritisch betrachtet werden. Gora-Stahlberg (2012) zeigte in

ihrer Arbeit, dass viele falsch positive Befunde bei Blutungen an der Gehirnoberfläche, sog. Subarachnoidalblutungen zu finden waren (9%, Spezifität 95%). Diese waren alle auf Suszeptibilitätsartefakte, also fokale Signalverluste an Grenzstellen von beispielsweise Luft zu Hirngewebe zurückzuführen. Suszeptibilitätsartefakte stellen sich - ähnlich wie Blut - in der T2*-gewichteten GE-Sequenz schwarz dar und erschweren die Unterscheidung zwischen Luftartefakten und Blut.

Die hohe Zuverlässigkeit der richtigen Befunderhebung (100%) der vorliegenden Arbeit lässt sich folgendermaßen erklären:

- Es wurden ausschließlich intrazerebrale Blutungen untersucht. Hier bilden sich auch postmortal selten Lufteinschlüsse, deshalb ist die Gefahr falsch positiver Befunde gering.
- Es lagen zusätzlich zu den T2*-gewichteten Bildern auch T1-gewichtete *3D-fast-spoiled-gradient-echo*-Bilder (FSPGR,3D) und protonendichte-gewichtete (PD-) *Fast-spin-echo*-Bilder (FSE-XL) vor, in denen Luft (schwarz) leicht von Gewebsdefekten (heller kontrastiert) wie Blut zu unterscheiden ist (Abb.12, 4.3.3).

In diesem Zusammenhang ist weiterhin zu beachten, dass nicht nur Blut und Luftblasen in der T2*-gewichteten GE-Sequenz Suszeptibilitätseffekte erzeugen, sondern auch andere Substanzen mit ähnlichen magnetischen Eigenschaften. Zu diesen zählen beispielsweise Melanin, Calcium, Knochen, diffuse axonale Schäden und kavernöse Malformationen (Valdez Hernandez et al. 2011, Greenberg et al. 2009, Ripoll et al. 2002). Die mittels der GE-Sequenz detektierten dunklen (hypointensen) Signalveränderungen sind also nicht spezifisch für Blut (Atlas et al. 1988). Um diese von Blut unterscheiden zu können ist die zusätzliche Verwendung o.g. Sequenzen

notwendig und machen diese Sequenzen für jede postmortale MRT-Untersuchung von Formalin-fixierten Gehirnen unverzichtbar (Gora-Stahlberg 2012, Yen et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die postmortale MRT unter Verwendung mehrerer Pulssequenzen bei der Diagnostik von intrazerebralen Blutungen unterschiedlicher Größe aufgrund der Vermeidung von Präparationsartefakten sowie der fehlenden Invasivität eine sinnvolle Ergänzung zur Histologie darstellt, keinesfalls aber eine gleichwertige Methode (Sensitivität <100%) ist.

5.1.4 Keine Altersschätzung mittels postmortaler MRT

Die vorliegende Arbeit konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Signalverhalten im MRT-Bild und dem Alter intrazerebraler Blutungen feststellen. Dieses Ergebnis fügt sich in die Untersuchungen von Ripoll et al. (2004, 2003 und 2002), die in experimentellen (2003 und 2002) und klinischen (2004 und 2003) Studien das Signalverhalten intrazerebraler Blutungen mittels verschiedener Pulssequenzen (FLAIR-, T1-gewichtete SE- und T2*-gewichtete GE-Sequenz) am Lebenden untersuchten. Auch sie bewiesen mithilfe der GE-Sequenz eine sehr hohe Sensitivität in der Diagnostik von Blut, konnten jedoch keine Korrelation zwischen der Signalintensität und dem Blutungsalter finden. Die Verwendung der GE-Sequenz ist also keine Methode, die eine Altersschätzung intrazerebraler Blutungen ermöglicht, weder in vivo noch postmortal.

Trotz teilweise widersprüchlicher Aussagen zu den jeweiligen Signalveränderungen ist hingegen am Lebenden die Nutzung der Spin-Echo-(SE)-Sequenz zur Altersschätzung größerer zerebraler Blutungen eine seit langem anerkannte Methode (Allkemper et al. 2004, Parizel et al. 2001). MRT-Bilder dieser Sequenz waren für die vorliegende Arbeit

jedoch nicht erstellt worden; einerseits hätte die zusätzliche Verwendung dieser Pulssequenz die für die rechtsmedizinische Routine vertretbar lange Untersuchungsdauer (<30min pro Gehirn) sowie die Budgetplanung überschritten, andererseits hatte sich bei im Vorhinein durchgeführten Probesequenzen der klinischen Routine - zu der auch die SE-Sequenz gehört - keine zufriedenstellende Bildqualität gezeigt (Gora-Stahlberg 2012). Ob folglich eine postmortale Altersschätzung intrazerebraler Blutungen unter Verwendung der SE-Sequenz in Zukunft möglich sein kann, erfordert weitere Untersuchungen und neue Studiendesigns.

5.2 Diskussion des Studiendesigns

5.2.1 Fallzahl

Viele Studien zur histologischen Wundaltersbestimmung verwendeten stets große Fallzahlen (ca. $n=100$) für ihre Untersuchungen (Hausmann 2006, Hausmann et al. 2000, Hausmann und Betz 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 39 Lokalisationen aus insgesamt 24 Gehirnen untersucht. Dennoch zeigte sich diese, im Vergleich relativ geringe Fallzahl, für eine erfolgreiche histologische Altersschätzung intrazerebraler Blutungen als ausreichend (siehe entsprechende Graphiken unter 4.2 und die statistisch signifikanten Korrelationskoeffizienten unter 4.5).

Auch für die magnetresonanztomographischen Untersuchungen wurde das Alter der jeweiligen Blutungen in 5 Klassen eingeteilt (hyperakute bis chronische Blutung, 3.3.2). Im Einzelnen lagen für die Auswertung der vorliegenden Arbeit in neun Gehirnen hyperakute Blutungen, in vier Gehirnen akute, in einem Gehirn eine früh subakute, in drei Gehirnen spät subakute und in fünf Gehirnen chronische Blutungen vor (3.3.1,

Tabelle 2). Insbesondere in den Fällen der subakuten Blutungen (n=1 und n=3) ist die Fallzahl sicherlich zu gering, um sichere Aussagen bezüglich einer Regelmäßigkeit in deren Signalverhalten treffen zu können. Auch war die Ermittlung einer Standardabweichung für die früh subakute Blutung (n=1) nicht möglich.

Es konnte jedoch für diese im Vergleich zu den jeweils jüngeren und älteren Blutungen kein signifikanter Unterschied im Signalverhalten gefunden werden. Diese Tatsache erlaubt zumindest die Schlussfolgerung, dass keine Altersschätzung der untersuchten Blutungen möglich ist.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin erwähnenswert, dass auch eine klinische Studie unter Verwendung einer deutlich größeren Fallzahl (n=82) bisher keine Altersschätzung zerebraler Blutungen mittels der T2*-gewichteten MRT vornehmen konnte (Ripoll et al. 2004). Hingegen verwendeten tierexperimentelle Studien über das Signalverhalten zerebraler Blutungen verschiedenen Alters meist sogar noch weitaus geringere Fallzahlen (n=7-15) als die vorliegende Arbeit (Ripoll et al. 2003 und 2002, Ripoll und Raininko 2002).

Letztlich kann auch unter Verwendung einer geringen Fallzahl festgehalten werden, dass die postmortale MRT eine hoch sensitive Methode bei der Ermittlung von Blutungen jeglichen Alters ist (5.1.3), eine Altersvorhersage anhand von Größe oder jeweiligem Signalverhalten erlaubt sie jedoch nicht.

5.2.2 Semiquantitative Auswertung der histologischen Präparate

Studien zur Wundaltersbestimmung führten eine quantitative Auswertung GFAP-positiver Astrozyten durch (Betz und Hausmann 2007, Hausmann 2006 und Hausmann et al. 2000). Diese sei aufgrund der physiologischen Nachweisbarkeit von GFAP-positiven Astrozyten in unverletztem Hirngewebe nötig (Betz und Hausmann 2007).

Weiterhin reagieren Astrozyten je nach Pathologie im ZNS mit einer Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) oder einer Hypertrophie (Zunahme der Zellgröße), welche mit einer Veränderung der Morphologie einhergeht (O'Callaghan et al. 1995, Norton et al. 1992). Deshalb empfiehlt Hausmann (2006) zur Wundaltersschätzung nach Schädel-Hirntrauma für einen hoch reliablen Informationsgewinn zusätzlich zur quantitativen auch eine qualitativ-morphometrische Analyse der Astrozyten.

Eisenmenger et al. (1978) kritisieren die semiquantitative Auswertung im Allgemeinen. Diese sei grundsätzlich sehr subjektiv in der Befundung und deren Ergebnisse folglich zu wenig aussagekräftig. Allerdings ist laut Betz und Hausmann (2007) eine semiquantitative Analyse nach Gewebsverletzung unter Verwendung des astrozytenspezifischen Markers Vimentin möglich. Dieses Filamentprotein habe gegenüber GFAP den Vorteil, dass es im adulten gesunden Gehirn nicht nachweisbar und folglich eine quantitative Analyse nicht nötig sei.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch mittels semiquantitativer Auswertung eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Menge Eisen-/GFAP-positiver Zellen und dem Blutungsalter ermittelt werden. Hierfür wurden auch in unverletztem Kontrollgewebe nachweisbare GFAP-positive Astrozyten berücksichtigt, indem gesundes, in weiter Entfernung zur Blutung befindliches Kontrollgewebe als intraindividueller Referenzwert mit den pathologisch veränderten Gewebeabschnitten verglichen wurde. So mussten beispielsweise, um einen Zählwert von $n=1$ zu erhalten, direkt um die Läsion deutlich mehr Astrozyten angefärbt sein als in der unverletzten Umgebung. Wiesen beide Areale gleich viele Astrozyten auf, so erfuhr die Läsion einen Zählwert von $n=0$. Diese Methode ist im Vergleich zur quantitativen Analyse zwar anfälliger für eine subjektive Begutachtung, dennoch erwies sie sich für eine erfolgreiche Altersschätzung intrazerebraler Blutungen als ausreichend.

5.2.2 Verwendung von 3 Tesla Magnetfeldstärke

Gora-Stahlberg (2012) diskutierte in ihrer Arbeit, dass die MRT unter Verwendung von 3 Tesla (*T*) Feldstärke aufgrund ihrer sehr guten Bildauflösung im Vergleich zu 1,5T MRT-Geräten eine sensitivere Ermittlung vieler intrazerebraler Pathologien ermöglicht. Allerdings konnten Allkemper et al. (2004) in einer klinischen Studie zum Vergleich unterschiedlich alter intrazerebraler Blutungen mittels der 1,5T- und 3T-MRT keine wesentlichen Unterschiede im Signalverhalten feststellen. Mithilfe beider Feldstärken wurden gleich viele Blutungen detektiert, unter Verwendung der 3T-MRT zeigte sich eine geringe Anzahl von Suszeptibilitätsartefakten. Hierzu postulieren auch Greenberg et al. (2009), dass die Verwendung einer höheren Feldstärke mit vermehrter Sensitivität für Suszeptibilitätsartefakte vor allem in der Ermittlung von zerebralen Mikroblutungen problematisch sein kann. Hier würden im Vergleich zu niedrigerer Feldstärke vermehrt nicht nur Blut, sondern alle paramagnetischen Substanzen ermittelt, wie beispielsweise kleinste Kalziumablagerungen, Lufteinschlüsse oder sehr kleine Metastasen eines malignen Melanoms. Folglich kann eine erhöhte Sensitivität in diesem Fall die Spezifität für Blutungen schwächen und die Gefahr falsch-positiver Befunde mittels der 3T-MRT erhöhen.

Wie bereits erläutert (5.1.3), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels der MRT keine falsch positiven Befunde erhoben. Die 3T-MRT erwies sich als eine sensitive und spezifische Methode für die postmortale Ermittlung intrazerebraler Blutungen.

5.3 Einfluss der Formalinfixierung

Die Fixierung von Hirngewebe in Formalin kann die Aussagefähigkeit der MRT und der Histologie beeinflussen. Hierzu werden die folgenden Phänomene kurz erläutert.

5.3.1 Contrast-to-Noise-Ratio in der MRT nicht berechenbar

Um die verschiedenen Signalintensitäten (SIen) in der MRT bei unterschiedlichen Individuen zu objektivieren und untereinander besser vergleichbar zu machen, kann am Lebenden die sog. Contrast-to-Noise-Ratio (CNR) berechnet werden. Sie ist beispielsweise für den Vergleich verschieden alter intrazerebraler Blutungen, gemessen in unterschiedlichen Pulssequenzen und Feldstärken (1,5T vs 3T), von Allkemper et al. (2004) verwendet worden. Auch Wintersperger et al. (2007) nutzten diese Messgröße zur Hirntumordiagnostik in vergleichenden MRT-Studien (1,5T vs 3T). Mittels der CNR lassen sich der Kontrast zweier Strukturen auch innerhalb eines Organs objektiver darstellen und somit die erhobenen Messdaten mit denen anderer Untersuchungen besser vergleichen (Bethke 2007).

Die CNR berechnet sich aus der Differenz der Signalintensität (SI) einer bestimmten Struktur - beispielsweise der weißen Substanz des Gehirns - und der SI einer zweiten Struktur - beispielsweise der grauen Substanz oder des Blutungsareals - geteilt durch die SI des Hintergrundrauschens eines MRT-Bildes:

$$CNR = ((SI \text{ Struktur } 1) - (SI \text{ Struktur } 2)) / (SI \text{ Hintergrundrauschen})$$

Folglich wäre es auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit theoretisch möglich gewesen, mithilfe der CNR die Unterschiede in den SIen der Hirnblutungen zu objektivieren um diese besser untereinander vergleichen zu können. Allerdings handelt es sich hier nicht um eine Studie am Lebenden, sondern um Formalin-fixiertes Gewebe. Die Gehirne waren vor der radiologischen Untersuchung alle unterschiedlich lange in

Formalin gelagert worden, manche einige Tage, viele mehrere Monate bis zu knapp einem Jahr.

Wie Gora-Stahlberg (2012) in ihrer Arbeit zeigt, verursacht die Fixierung in Formalin in Abhängigkeit von der Zeit eine Verlängerung der T1- und T2-Relaxationszeiten, was zu einer Kontrastabschwächung bis hin zu einer Kontrastumkehr im MRT-Bild führen kann. Die graue Hirnsubstanz, die im T1-gewichteten MRT-Bild zunächst dunkler (hypointens) erscheint, wird mit zunehmender Fixierungsdauer im MRT-Bild heller (hyperintens). Dieser Vorgang beginnt unmittelbar nach der Fixierung und ist laut Gora-Stahlberg (2012) frühestens ab dem 25. Tag abgeschlossen. Aufgrund der unterschiedlich langen Lagerung der Gehirne in Formalin war deren jeweiliger Grad der Kontrastumkehr nicht einheitlich und folglich kein standardisierter Vergleich der unterschiedlichen Signalintensitäten mittels der CNR möglich.

5.3.2 Geringe Gewebeschrumpfung durch Formalin

Wie bereits erwähnt (1.6.2) ist durch die formalinbedingte leichte Abnahme des Wassergehaltes von einer geringen Gewebeschrumpfung nach Fixierung auszugehen (Fox et al. 1985). Blutungen können theoretisch im MRT-Bild minimal kleiner erscheinen als sie tatsächlich sind. Dem gegenüber steht das Postulat von Greenberg et al. (2009), die in einer Studie zur Diagnostik zerebraler Mikroblutungen den sog. „Blooming-Effekt“ beschreiben. Dieser ursprünglich aus der Digitalfotographie stammende Begriff beschreibt ein Bildverzerrungsphänomen und lässt die Blutungsareale im T2*-gewichteten MRT-Bild minimal größer erscheinen als sie tatsächlich sind. Hierfür verantwortlich sind unter anderem Suszeptibilitätseffekte, die

an Grenzstellen von Geweben mit unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften wie Blut und Hirngewebe hervorgerufen werden.

Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die formalinbedingte minimale Gewebsschrumpfung durch den Blooming-Effekt zumindest optisch ausgeglichen wird.

5.3.3 Ein langes postmortem Intervall verringert die Aussagekraft der IHC

Für ein gutes Färbeergebnis sollte in der immunhistochemischen Färbung von Astrozyten das postmortem-Intervall möglichst kurz gehalten werden, da mit zunehmendem Verwesungsprozess (> fünf Tage) die Stabilität des Proteins GFAP bzw. dessen Tertiärstruktur und somit die Erreichbarkeit für Antikörper nachlässt. Die Aussagefähigkeit der Immunhistochemie (*IHC*) kann folglich beeinträchtigt werden (Steinriede 2005, Eng und Ghirnikar 1994, Knudsen und Pallesen 1986). Laut Jacque (1991) ist eine postmortale Degeneration des humanen GFAP bereits ab 20 Minuten nach Todeseintritt elektrophoretisch nachweisbar. Um dies zu verhindern ist eine schnelle Fixierung des Gewebes, beispielsweise in Formalin, erforderlich.

5.3.4 Formalin beeinträchtigt die Aussagefähigkeit der (Immun-)Histochemie

Je länger die Fixierungsdauer, desto mehr Fixationsartefakte in Form von schwarzen Formalinpigmentablagerungen können sich im histologischen Schnittpräparat ausbilden (Betz und Hausmann 2007). Ihr Vorhandensein kann durch ihre ähnliche Farbgebung (schwarz) die lichtmikroskopische Auswertung der Eisenablagerungen (blau bis dunkelblau) und der mittels GFAP gefärbten Astrozyten (hell-bis dunkelbraun) erschweren (Abb.12, 4.6). Tatsächlich gestaltete sich in der vorliegenden Arbeit die Unterscheidung zwischen Fixationsartefakten und zu untersuchendem Gewebe als

problemlos. Astrozyten und Siderophagen haben neben ihrer stets helleren Farbe auch eine andere Morphologie als Formalinpigment (z.B. sternförmig mit Ausläufern). Mithilfe der bis zu 200fachen lichtmikroskopischen Vergrößerungen waren all jene Strukturen gut von Formalinpigmenten abgrenzbar.

Ein weiteres Problem bei Formalin-fixiertem Gewebe beschreiben Davison et al. (1995). Durch Einwirkung des Formalins würden viele Proteine miteinander vernetzt (Crosslinking), wodurch diese einen Großteil ihrer antigenen Eigenschaften verlieren könnten. Je länger die Fixierungsdauer, desto umfangreicher sei der Prozess des Crosslinking, welcher mithilfe verschiedener Verfahren nur teilweise rückgängig gemacht werden kann. Viele immunhistochemische Untersuchungen können nach Meinung der o.g. Autoren nur schlecht an schon lange in Formalin-fixiertem Material durchgeführt werden, da eine lange Fixierungsdauer die Erreichbarkeit des Zielproteins GFAP durch den Antikörper verringert.

Eine gegenteilige Meinung postulieren McLendon und Bigner (1994). Sie empfehlen die Formalin-Fixierung: Epitope, an die die Antikörper binden, könnten durch Formalin effektiver freigelegt werden. Eng und Ghirnikar (1994) sprechen in diesem Zusammenhang sogar von einem Rückgang von GFAP-Epitopen bei Aldehyd-Fixation gegenüber der Formaldehydfixierung. Sie beschreiben weiterhin, dass es nach Eintritt des Todes, schon vor der Fixierung, durch Formveränderung des Proteins GFAP zu einer vermehrten Freilegung von dessen Epitopen und dadurch auch nach Fixierung zu einer besseren Anfärbbarkeit kommt. Auch Lyck et al. (2008) weisen einen signifikanten Rückgang der Anfärbbarkeit des GFAP erst bei einer Formalinfixierungszeit von 10 Jahren nach. Ein in allen Fällen (n=29) gutes Färbeergebnis zeige sich in deren Studie bei einer Fixationszeit von bis zu drei Jahren in 0,1%iger Paraformaldehydlösung.

Das Gewebe der vorliegenden Arbeit war bis zur histologischen Untersuchung im Mittel ca. 2,5 Jahre (Streuung von +/- maximal vier Monaten) in Formalin fixiert. Dabei war das Färbeergebnis in allen Schnitten zufriedenstellend.

Geht man von einer verringerten Anfärbbarkeit des GFAP durch lange Formalinfixierung (>3 Jahre) aus, so lässt sich festhalten, dass sich die Artefaktbildung durch Formalin in der MRT und der Histologie zeitlich entgegengesetzt verhält: Eine sehr lange Fixierungsdauer führt im MRT-Bild zu einer Kontrastumkehr. Dies würde eine Messung der CNR und folglich eine objektivere Begutachtung ermöglichen (5.3.1). In der histologischen Begutachtung verhält es sich zumindest laut Davison et al. (1995) genau entgegengesetzt (s.o.).

6. Zusammenfassung

In der rechtsmedizinischen Diagnostik stellt sich regelmäßig die Frage nach Todesursache und Todesart. Für deren Rekonstruktion kann das Alter von intrazerebralen Blutungen von entscheidender Bedeutung sein.

Astrozyten reagieren auf Verletzungen des Gehirns mit Proliferation und Hypertrophie (Astrogliose). Hierfür produzieren sie unter anderem vermehrt das astrozytenspezifische Protein GFAP. Dieses lässt sich mithilfe immunhistochemischer Methoden lichtmikroskopisch darstellen. Des Weiteren lassen sich Blutabbauprodukte wie Eisen und Hämosiderin histochemisch sowie magnetresonanztomographisch nachweisen.

Diverse Studien zur histologischen Altersbestimmung intrazerebraler Blutungen mittels (immun-) histochemischer Methoden zeigen eine hohe Korrelation zwischen dem Alter einer Blutung und der Menge an reaktiven Astrozyten bzw. Eisenablagerungen. Hier ist eine signifikant erhöhte Anzahl im posttraumatischen Intervall zwischen ca. einem Tag und vier Wochen zu erwarten.

In der Magnetresonanztomographie (MRT) am Lebenden sind bisher nur unter Nutzung der sog. Spin-Echo-(SE)-Sequenz unterschiedliche, für das jeweilige Alter einer intrazerebralen Blutung charakteristische Signaleigenschaften (hypo-, iso – oder hyperintens) bekannt. Die Nutzung der für die Diagnostik von Blut jedoch wesentlich sensitiveren T2*- gewichteten (GE)- Sequenz hat sich bisher weder am Lebenden noch postmortal zur Altersbestimmung als hilfreich erweisen können.

Histologische Methoden zur Wundaltersschätzung sind in der rechtsmedizinischen Praxis seit langem etabliert, bildgebende Verfahren hingegen nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, postmortale 3-Tesla Magnetresonanztomographie-Befunde von intrazerebralen Blutungen mit deren histologischer Altersschätzung zu vergleichen. Hierzu ergaben sich im Einzelnen folgende Fragen:

1. Stimmt die histologische Altersschätzung intrazerebraler Blutungen der vorliegenden Arbeit mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen überein?
2. Ist die postmortale MRT eine sinnvolle Ergänzung zur Histologie bei der Diagnostik von intrazerebralen Blutungen?
3. Erlauben - ausgehend von den bekannten Möglichkeiten der MRT zur Altersschätzung von intrazerebralen Blutungen in vivo – auch postmortale MRT-Befunde von intrazerebralen Blutungen Rückschlüsse auf deren Alter? Kann folglich die postmortale MRT einen Beitrag zur Altersschätzung von intrazerebralen Blutungen leisten?
4. Welche Probleme kann die Formalinfixierung bei der histologischen und magnetresonanztomographischen Diagnostik von Blut bereiten?

Es wurden 24 Gehirne ex situ mittels der MRT sowie histologisch untersucht. Die von Blutungen betroffenen Gehirnareale (n=39) wurden mittels vorliegender MRT-Bilder in verschiedenen Pulssequenzen (GE-, FSPGR3D und FSE-XL) auf Blutungszeichen untersucht und deren Signalveränderungen sowie deren Größe mit dem jeweils bekannten Blutungsalter in Zusammenhang gebracht. Des Weiteren wurden histologische Schnittpräparate der zuvor in Formalin fixierten Blutungsareale für die Färbungen angefertigt. Mittels der H.-E.-Färbung wurden zunächst makroskopisch ermittelte Blutungen bestätigt und anschließend mithilfe der histochemischen Eisen-III- und immunhistochemischen GFAP-Färbung eine Altersschätzung der Blutungen vorgenommen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ auf lichtmikroskopischer Ebene und anschließend mit statistischen Methoden.

Die im Mittel 2,5 Jahre in Formalin fixierten Gewebeproben zeigten in allen Fällen ein zufriedenstellendes Färbeergebnis. Trotz des Nachweises fixationsbedingter Formalinpigmentablagerungen in ca. der Hälfte der Präparate, war eine Unterscheidung zwischen Formalin und auszuwertendem Gewebe aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation sowie Farb- und Formgebung problemlos möglich.

Wie aus der Literatur bekannt, konnte auch in der vorliegenden Arbeit mithilfe histologischer Methoden eine Altersschätzung der Blutungen vorgenommen werden, mittels der postmortalen MRT jedoch nicht. Auch wenn unter Nutzung der T2*-gewichteten (GE)-Sequenz die postmortale MRT als sensitive Nachweismethode von intrazerebralen Blutungen aufgrund der fehlenden Invasivität eine sinnvolle Ergänzung zur Histologie darstellt, so ist sie dieser sicherlich nicht gleichwertig.

Ferner erweist sich nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit die postmortale MRT für eine Altersschätzung intrazerebraler Blutungen als nicht hilfreich, hier konnte kein größen- und altersspezifisches Signalverhalten ermittelt werden.

7. Literaturverzeichnis

Agresti, A., & Coull, B. A. (1998). Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 52(2), 119-126.

Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675-677.

Allkemper, T., Tombach, B., Schwindt, W., Kugel, H., Schilling, M., Debus, O., et al. (2004). Acute and subacute intracerebral hemorrhages: comparison of MR imaging at 1.5 and 3.0 T--initial experience. *Radiology*, 232(3), 874-881.

Atlas, S. W., Mark, A. S., Grossman, R. I., & Gomori, J. M. (1988). Intracranial hemorrhage: gradient-echo MR imaging at 1.5 T. Comparison with spin-echo imaging and clinical applications. *Radiology*, 168(3), 803-807.

Atlas, S. W., & Thulborn, K. R. (1998). MR detection of hyperacute parenchymal hemorrhage of the brain. *AJNR Am J Neuroradiol*, 19(8), 1471-1477.

Bethke, A. (2007), Dissertationsschrift. Klinische Untersuchung der hepatobiliären Kinetik von Gd-EOB-DTPA im Hochfeldmagnetresonanztomographen. Charité – Berlin, Berlin.

Betz, P., & Hausmann, R. (2007). Praktische Wundaltersschätzung. *Rechtsmedizin*, 17(1), 55-66.

Boenisch, T., & Henne, C. (2003). Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Auflage. DakoCytomation, Hamburg.

Bradley, W. G., Jr. (1993). MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology*, 189(1), 15-26.

Broderick, J. P., Adams, H. P., Jr., Barsan, W., Feinberg, W., Feldmann, E., Grotta, J., et al. (1999). Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 30(4), 905-915.

Brown, L. D., Cai, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 101-117.

Davison, F. D., Groves, M., & Scaravilli, F. (1995). The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by in situ end-labelling of DNA. *Histochem J*, 27(12), 983-988.

Eisenmenger, W., Gilg, P., Diem, G., & Neuhaus, T. (1978). Histological and histochemical age determination of closed cerebral cortex injuries. *Beitr Gerichtl Med*, 36, 281-289.

Ekmark-Lewén, S., Lewén, A., Israelsson, C., Li, G. L., Farooque, M., Olsson, Y., et al. (2010). Vimentin and GFAP responses in astrocytes after contusion trauma to the murine brain. *Restorative neurology and Neuroscience*, 28(3), 311-321.

Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*, 8(4-6), 203-214.

Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, 4(3), 229-237.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25(9-10), 1439-1451.

Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., & Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28(2), 351-354.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33(8), 845-853.

Gentry, L. R., Godersky, J. C., & Thompson, B. (1988). MR imaging of head trauma: review of the distribution and radiopathologic features of traumatic lesions. *AJR Am J Roentgenol*, 150(3), 663-672.

Gora-Stahlberg, G. (2012), Dissertationsschrift. Postmortale 3-Tesla-Magnetresonanztomographie Formalin-fixierter menschlicher Gehirne aus dem klassischen Fallspektrum der Rechtsmedizin. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Greenberg, S. M., Finklestein, S. P., & Schaefer, P. W. (1996). Petechial hemorrhages accompanying lobar hemorrhage: detection by gradient-echo MRI. *Neurology*, 46(6), 1751-1754.

Greenberg, S. M., Vernooij, M. W., Cordonnier, C., Viswanathan, A., Al-Shahi Salman, R., Warach, S., et al. (2009). Cerebral microbleeds: a field guide to their detection and interpretation. *Lancet Neurol*, 8(2), 165-174.

Haacke, E. M., Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., & Cheng, Y. C. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1. *AJNR Am J Neuroradiol*, 30(1), 19-30.

Hausmann, R. (2006). Age determination of brain contusions. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 2(2), 85-93.

Hausmann, R., & Betz, P. (2000). The time course of the vascular response to human brain injury--an immunohistochemical study. *Int J Legal Med*, 113(5), 288-292.

Hausmann, R., Kaiser, A., Lang, C., Bohnert, M., & Betz, P. (1999). A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *Int J Legal Med*, 112(4), 227-232.

Hausmann, R., Riess, R., Fieguth, A., & Betz, P. (2000). Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *Int J Legal Med*, 113(2), 70-75.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*, 6, 65-70.

Höpken, H. H. (2005), Dissertationsschrift. Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel neuraler Zellen. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen.

Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.

Huisman, T. A. (2005). Intracranial hemorrhage: ultrasound, CT and MRI findings. *Eur Radiol*, 15(3), 434-440.

Jacque, C. M. (1991). The glial fibrillary acidic protein. *Presse Med*, 20(29), 1384-1390.

Jänisch, W., Schreiber, D., Warzok, R. (1990). *Neuropathologie – Pathomorphologie und Pathogenese neurologischer Krankheiten*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Jakob, S. (2007), Dissertationsschrift. Heterogenität der reaktiven Makrophagen/Mikroglia nach traumatischen Rindenblutungen am Gehirn-Ein Beitrag zur Einschätzung der Überlebenszeit eines Schädel-Hirn-Traumas. Universität zu Lübeck, Lübeck.

Jones, N. R., Blumbergs, P. C., Brown, C. J., McLean, A. J., Manavis, J., Perrett, L. V., et al. (1998). Correlation of postmortem MRI and CT appearances with neuropathology in brain trauma: a comparison of two methods. *J Clin Neurosci*, 5(1), 73-79.

Karger, B., Puskas, Z., Ruwald, B., Teige, K., & Schuirer, G. (1998). Morphological findings in the brain after experimental gunshots using radiology, pathology and histology. *Int J Legal Med*, 111(6), 314-319.

Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, 45(2-3), 191-202.

Knudsen, L. M., & Pallesen, G. (1986). The preservation and loss of various non-haematopoietic antigens in human post-mortem tissues as demonstrated by monoclonal antibody immunohistological staining. *Histopathology*, 10(10), 1007-1014.

Lang, G. (2006). *Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; für MTA und biomedizinische Analytikerinnen*. 1. Auflage. Springer Verlag, Wien New York.

Li, H., Wang, S. R., Wang, L. K., Chen, X. F., Zhao, C. J., Duan, S., et al. (2010). Perihematoma pathological changes in neurons and astrocytes following acute cerebral hemorrhage. *Int J Neurosci*, 120(11), 683-690.

Linfante, I., Llinas, R. H., Caplan, L. R., & Warach, S. (1999). MRI features of intracerebral hemorrhage within 2 hours from symptom onset. *Stroke*, 30(11), 2263-2267.

Loberg, E. M., & Torvik, A. (1989). Brain contusions: the time sequence of the histological changes. *Med Sci Law*, 29(2), 109-115.

Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schrøder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(3), 201-221.

Mackenzie, J. M., & Clayton, J. A. (1999). Early cellular events in the penumbra of human spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 8(1), 1-8.

McLendon, R. E., & Bigner, D. D. (1994). Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol*, 4(3), 221-228.

Nakase, T., Sohl, G., Theis, M., Willecke, K., & Naus, C. C. (2004). Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol*, 164(6), 2067-2075.

Nedergaard, M., & Dirnagl, U. (2005). Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 50(4), 281-286.

Nighoghossian, N., Hermier, M., Adeleine, P., Blanc-Lasserre, K., Derex, L., Honnorat, J., et al. (2002). Old microbleeds are a potential risk factor for cerebral bleeding after ischemic stroke: a gradient-echo T2*-weighted brain MRI study. *Stroke*, 33(3), 735-742.

Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C., & Brosnan, C. F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res*, 17(9), 877-885.

O'Callaghan, J. P., Jensen, K. F., & Miller, D. B. (1995). Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochem Int*, 26(2), 115-124.

Oehmichen, M., Eisenmenger, W., & Raff, G. (1981). Theoretical-experimental and statistical principles of cytomorphologic age determination of traumatic cortical hemorrhage. *Beitr Gerichtl Med*, 39, 57-72.

Oehmichen, M., Meissner, C., Schmidt, V., Pedal, I., König, H. G., & Saternus, K. S. (1998). Axonal injury--a diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. *Forensic Sci Int*, 95(1), 67-83.

Oehmichen, M., Walter, T., Meissner, C., & Friedrich, H. J. (2003). Time course of cortical hemorrhages after closed traumatic brain injury: statistical analysis of posttraumatic histomorphological alterations. *Journal of neurotrauma*, 20(1), 87-103.

Olivot, J. M., Mlynash, M., Kleinman, J. T., Straka, M., Venkatasubramanian, C., Bammer, R., et al. (2010). MRI profile of the perihematomal region in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 41(11), 2681-2683.

Parizel, P. M., Makkat, S., Van Miert, E., Van Goethem, J. W., van den Hauwe, L., & De Schepper, A. M. (2001). Intracranial hemorrhage: principles of CT and MRI interpretation. *Eur Radiol*, 11(9), 1770-1783

Patel, M. R., Edelman, R. R., & Warach, S. (1996). Detection of hyperacute primary intraparenchymal hemorrhage by magnetic resonance imaging. *Stroke*, 27(12), 2321-2324.

Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434.

R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

Ripoll, M. A. (2003). MRI Diagnosis of Intracranial Hemorrhage: Experimental and Clinical Studies. Uppsala University.

Ripoll, M. A., Gustafsson, O., Siosteen, B., Olsson, Y., & Raininko, R. (2002). MR follow-up of small experimental intracranial haemorrhages from hyperacute to subacute phase. *Acta Radiol*, 43(1), 2-9.

Ripoll, M. A., & Raininko, R. (2002). Experimental intracerebral and subarachnoid/intraventricular haemorrhages. *Acta Radiol*, 43(5), 464-473.

Ripoll, M. A., Siosteen, B., Hartman, M., & Raininko, R. (2003). MR detectability and appearance of small experimental intracranial hematomas at 1.5 T and 0.5 T. A 6-7-month follow-up study. *Acta Radiol*, 44(2), 199-205.

Ripoll, M. A., Stenborg, A., Sonninen, P., Terent, A., & Raininko, R. (2004). Detection and appearance of intraparenchymal haematomas of the brain at 1.5 T with spin-echo, FLAIR and GE sequences: poor relationship to the age of the haematoma. *Neuroradiology*, 46(6), 435-443.

Romeis, B. (1989). *Mikroskopische Technik*. 17., neubearbeitete Auflage. Urban und Schwarzenberg Verlag, München.

Roob, G., Schmidt, R., Kapeller, P., Lechner, A., Hartung, H. P., & Fazekas, F. (1999). MRI evidence of past cerebral microbleeds in a healthy elderly population. *Neurology*, 52(5), 991-994.

Seidenwurm, D., Meng, T. K., Kowalski, H., Weinreb, J. C., & Kricheff, II. (1989). Intracranial hemorrhagic lesions: evaluation with spin-echo and gradient-refocused MR imaging at 0.5 and 1.5 T. *Radiology*, 172(1), 189-194.

Siebner, H., Gräfin von Einsiedel, H., Wilhelm, T., Auer, C., & Conrad, B. (1999). Die "Häm"-Sequenz (T2*-gewichtete Gradienten-Echo-Magnetresonanztomographie Stellenwert in der Differentialdiagnose spontaner intrazerebraler Blutungen. *Der Nervenarzt*, 70(8), 714-722.

Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5(2), 146-156.

Steiner, J., Bernstein, H. G., Biela, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., et al. (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*, 8, 2.

Steinriede, A. (2005), *Dissertationsschrift. Eingrenzung der Leichenliegezeit mittels immunhistochemischer Untersuchung des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Astrocyten*. Universität Tübingen, Tübingen.

Stewart, W., Black, M., Kalimo, H., & Graham, D. I. (2004). Non-traumatic forensic neuropathology. *Forensic Sci Int*, 146(2-3), 125-147.

Stoll, G., Jander, S., & Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*, 56(2), 149-171.

Struffert, T., & Reith, W. (2003). Brain and head injury. Part 1: Clinical classification, imaging modalities, extra-axial injuries, and contusions. *Radiologe*, 43(10), 861-875; quiz 876-867.

Thulborn, K. R., Sorensen, A. G., Kowall, N. W., McKee, A., Lai, A., McKinstry, R. C., et al. (1990). The role of ferritin and hemosiderin in the MR appearance of cerebral hemorrhage: a histopathologic biochemical study in rats. *AJR Am J Roentgenol*, 154(5), 1053-1059.

Valdes Hernandez, M. C., Jeong, T. H., Murray, C., Bastin, M. E., Chappell, F. M., Deary, I. J., et al. (2011). Reliability of two techniques for assessing cerebral iron deposits with structural magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*, 33(1), 54-61.

Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6(8), 626-640.

Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, 86(4), 342-367.

Wardlaw, J. M. (2011). Post-mortem MR brain imaging comparison with macro- and histopathology: useful, important and underused. *Cerebrovasc Dis*, 31(5), 518-519.

Weishaupt, D., Köchli, V. D., & Marincek, B. (2009). *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung; mit 61 Abbildungen und 9 Tabellen*. 6. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg.

Wiesmann, M., & Brückmann, H. (1998). Diagnostic imaging of acute head and brain injuries. *Radiologe*, 38(8), 645-658.

Wintersperger, B. J., Runge, V. M., Biswas, J., Reiser, M. F., & Schönberg, S. O. (2007). Brain tumor enhancement in MR imaging at 3 Tesla: comparison of SNR and CNR gain using TSE and GRE techniques. *Investigative radiology*, 42(8), 558-563.

Yen, K., Lovblad, K. O., Scheurer, E., Ozdoba, C., Thali, M. J., Aghayev, E., et al. (2007). Post-mortem forensic neuroimaging: correlation of MSCT and MRI findings with autopsy results. *Forensic Sci Int*, 173(1), 21-35.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Fachliche Abkürzungen

- A.d. Aqua destillata
- Ag-Ak-Reaktion Antigen- Antikörper- Reaktion
- CNR Contrast-to-Noise-Ratio, Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis
- Deoxy-Hb Deoxy-Hämoglobin
- GE Gradientenecho
- GFAP glial fibrillary acidic protein
- IHC Immunhistochemie
- KHK Koronare Herzerkrankung
- LMU Ludwig-Maximilians-Universität München
- Met-Hb Methämoglobin
- MRT Magnet- Resonanz- Tomographie
- OKI oberes Konfidenzintervall
- o.p.B ohne pathologischen Befund
- OxyHb Oxyhämoglobin
- pAk primärer Antikörper
- p.m. postmortem
- SE Spinecho
- SHT Schädel-Hirn-Trauma
- SI Signalintensität
- SIen Signalintensitäten
- SNR Signal-to-Noise-Ratio (Signal- zu-Rausch-Verhältnis)

- T Tesla
- UKI unteres Konfidenzintervall
- ZNS zentrales Nervensystem

Nicht-fachliche Abkürzungen

- Abb. Abbildung
- bzgl. bezüglich
- bzw. beziehungsweise
- ca circa
- cm Zentimeter
- d.h. das heißt
- et al. et alii (und andere)
- ggf. gegebenenfalls
- gr. griechisch
- min. Minute (-n)
- n Anzahl
- o.g. oben genannt (-e,-er)
- s.o. siehe oben
- s.u. siehe unten
- u.a. unter anderem
- V.a. Verdacht auf
- vs versus
- z.B. zum Beispiel

8.2 Chemikalien

1. Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein- Antikörper (anti- GFAP Antikörper): Clone 6F2. Host/Isotype: Mouse IgG1-kappa.

Bezugsquelle: DakoCytomation GmbH, Code-Nr. M 0761

2. Zur Re- und Dehydratation verwendete „Alkoholreihe“ = mit Methylethylketon vergälltes 100%iges Ethanol, jeweils in 70, 80, 90 und 99,9 -%iger Verdünnung
3. Kernechtrot: 0,1%, filtriert, Firma SAV Liquid Productions GmbH, Flintsbach am Inn, Chargen- Nummer: 0001475
4. Hämalaun- Lösung: Firma SAV Liquid Productions GmbH, Flintsbach am Inn

8.3 Färbeprotokolle

8.3.1 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

- Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in absteigender „Alkoholreihe“ (siehe 7.2 Chemikalien) (2x99,9%ig, 2x90%ig, 2x80%ig, 2x70%ig) für jeweils 2 Minuten
- Einlegen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Kernfärbung in Mayer's Hämalaun für 15 Minuten
- Spülen in Leitungswasser
- Bläuen im lauwarmen Leitungswasser (Fixierung der Färbung) für 5 Minuten
- Gegenfärbung (Plasmafärbung) in 2%-iger wässriger Eosin-Y (Y= yellow) - Lösung, angesäuert mit Eisessig für 5-10 Minuten
- Spülen in Aqua destillata für 5-10 Minuten
- Dehydratation in aufsteigender „Alkoholreihe“ (siehe 7.2 Chemikalien) (2x70%ig, 2x80%ig, 2x90%ig, 2x99,9%ig) für jeweils 2 Minuten

- Einlegen in Xylol 2x für je 10 Minuten
- Manuelles Eindecken der Schnitte mit lösungsmittelhaltigem Einschlussmedium

8.3.2 Mayer's Hämalan

- 1g Hämatoxylin
- 1 Liter Aqua destillata
- 0,2g KJO_3 (zur künstlichen Reifung, oxidiert Hämatoxylin zu Hämatein)
- 50g Aluminium-Kaliumsulfat (Beize)

→ kurz erwärmen oder über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen

- 50g Chloralhydrat (Stabilisator)
- 1g Citronensäure (senkt den pH-Wert)

→ kurz aufkochen oder über mehrere Tage stehen lassen

Alternativ: Fertige „Mayer's Hämalan“-Mischung (Firma SAV liquid Production GmbH, Flinsbach am Inn), vor Gebrauch zu filtrieren

8.3.3 Eisen- III- Färbung („Berliner- Blau- Reaktion“)

- Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in absteigender „Alkoholreihe“ (siehe 7.2 Chemikalien) (2x 99,9%ig, 2x90%ig, 2x80%ig, 2x70%ig) für jeweils 2 Minuten
- Einlegen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Inkubation in frisch hergestellter 2%iger HCL-Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung für 60 Minuten
- Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Gegenfärbung in 0,1%igem filtriertem Kernechtrot für 10 Minuten

- Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Dehydratation in aufsteigender „Alkoholreihe“ (siehe 7.2 Chemikalien) (2x70%ig, 2x80%ig, 2x90%ig, 2x99,9%ig) für jeweils 2 Minuten
- Einlegen in Xylol 2x für je 10 Minuten
- Eindecken der Schnitte mit lösungsmittelhaltigem Einschlussmedium

8.3.4 Immunhistochemie (GFAP- Färbung)

I. Entparaffinierung und Vorbereitung für die Immunhistochemie:

- Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in absteigender „Alkoholreihe“ (siehe 7.2 Chemikalien) (2x99,9%ig, 2x90%ig, 2x80%ig, 2x70%ig) für jeweils 2 Minuten
- Einlegen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Hintergrundreduktion durch 3%ige H_2O_2 Lösung (180 ml Aqua destillata + 20 ml 30%-iges H_2O_2) für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität für 10 Minuten
- Reinigung in Aqua destillata für 5 Minuten
- Waschen in 0.9%iger NaCl-Phosphate-buffered-saline Puffer-Lösung (=PBS Puffer) für 10 Minuten
- Blockierung unspezifischer Bindungen durch 10%iges nicht-immun-Serum für 10 Minuten

II. Immunhistochemie

- Inkubation mit dem unter 7.2.1 genannten Primärantikörper GFAP über Nacht bei 2-8°C (im Kühlschrank)
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit dem biotinilierten Sekundärantikörper für 15 Minuten
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 15 Minuten
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten

III. Färbung / Gegenfärbung

- Inkubation mit DAB-Lösung (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Substrate Kit)
- Waschen in Aqua destillata für 10 Minuten
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 10 Minuten
- „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 7.2 Chemikalien) (2x70%ig, 2x80%ig, 2x90%ig, 2x99,9%ig) für jeweils 2 Minuten
- Einlegen in Xylol 2x je 10 Minuten
- Manuelles Eindecken der Schnitte in lösungsmittelhaltigem Einschlussmedium

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Graw, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich sehr für die Überlassung des spannenden Themas, für seine freundliche Unterstützung und konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Andreas Büttner, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock, für die stetige fachliche, konstruktive sowie äußerst menschliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit. Außerdem bedanke ich mich für die große Freiheit bei der Ausarbeitung der Arbeit und sein entgegengebrachtes Vertrauen.

Weiterhin danke ich herzlich meiner Betreuerin Frau Dr. med. Gina Gora-Stahlberg für ihre Geduld, die effektiven Gespräche und Ratschläge, die in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mit ihrer freundschaftlichen Unterstützung stand sie mir stets zur Seite.

Einen herzlichen Dank für die große Hilfe bei der Anfertigung der Färbungen und Fotos richte ich an die beiden MTA's des Instituts für Rechtsmedizin der LMU München, Frau Susanne Ring und an Frau Brigitte Mack, MTA der HNO- Forschung der LMU München, Standort Großhadern, sowie an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires, Leiter der HNO-Forschung der LMU München, Standort Großhadern.

Für seine große Hilfe bei der statistischen Auswertung, seine stets konstruktive Kritik, seine Liebe und Geduld danke ich meinem Freund, Dipl. Ing. Sebastian Gresset. Du bist der Beste.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern. Sie waren nicht nur bei der kritischen Durchsicht der Arbeit eine große Hilfe, sondern sie gaben mir unermüdlich mit Ihrer Geduld, Liebe und emotionalen Unterstützung die nötige Kraft und Motivation. Ihr seid die besten Eltern, die man sich wünschen kann!

Eidesstattliche Versicherung:

Ich, Katharina Kaliebe, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Postmortale magnetresonanztomographische Befunde intrazerebraler Hämorrhagien im Vergleich zu deren histologischer Altersschätzung“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Katharina Kaliebe, Doktorandin