Alter und Vitalität von konjunktivalen Stauungsblutungen

-

Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen

ANTJE WYß

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Alter und Vitalität von konjunktivalen Stauungsblutungen -

Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Antje Wyß

aus Friedrichroda

Gießen 2007

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

der Justus-Liebig-Universität

Leiter: Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. M. Verhoff

Gutachter: Frau Prof. Dr. B. Lorenz

Tag der Disputation: 25.11.2008

Für

Johanna und Wolfgang

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Überlegungen zur Pathogenese konjunktivaler Petechien im historischen Überblick 1

1.2 Die Konjunktiva: Anatomie und Funktion 5

1.3 Die frühe Wundheilungsreaktion an der Bindehaut und die endothelialen Adhäsionsmoleküle 7

1.3.1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) 8

1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 10

1.3.3 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) 11

1.3.4 P-Selektin (CD62-P-Antigen) 12

1.4 Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 15

1.5 Ziele der Arbeit 15

2 Material und Methoden 17

2.1 Material 17

2.1.1 Autolysezeichen 17

2.1.2 Zuordnung der Gruppen 17

2.1.3 Untersuchungsgut 20

2.1.4 Entnahme und Bearbeitung der Proben 25

2.1.5 Primär- und Sekundärantikörper 25

2.1.6 Positiv- und Negativkontrollen 26

2.2 Methoden 27

2.2.1 Färbung der Schnitte für lichtmikroskopische Untersuchungen .. 27

2.2.2 Färbung der Schnitte für fluoreszenzmikroskopische Detektionsmethode (CLSM) 29

2.2.3 Auswertung und Dokumentation 30

2.2.4 Analyse der immunhistochemischen Färbung 30

2.2.5 Statistische Methoden 31

3 Ergebnisse 33

3.1 Lichtmikroskopische Untersuchung mit VCAM-1 33

3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung mit VEGF und PDGFR 34

3.3 Lichtmikroskopische Untersuchung mit P-Selektin 35

3.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit P-Selektin 37

4 Diskussion 49

4.1 VCAM-1 49

4.2 VEGF und PDGFR 51

4.3 P-Selektin als Vitalitätsparameter 52

5 Zusammenfassung und Ausblick 56

6 Abstract 58

7 Literaturverzeichnis 60

8 Erklärung 70

9 Lebenslauf 71

10 Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen 74

11 Danksagung 75

12 Anhang 77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Konjunktiva und Kapillargefäß 7

Abbildung 2 Fälle mit moderater bis starker Endothelreaktion (in %) 41

Abbildung 3 Prozentuale Verteilung intraluminaler Gerinnsel 41

Abbildung 4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung (CLSM) von P-Selektin an vital entstandenen konjunktivalen Petechien 42

Abbildung 5 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung (CLSM) von P-Selektin an unverletzten Konjunktiven 43

Abbildung 6 Fluoreszenzmikroskopische Darstelllung (CLSM) von P-Selektin an vital entstandenen konjunktivalen Petechien, stark gestaute Gefäße 44

Abbildung 7 Fluoreszenzmikroskopische Darstelling (CLSM) von P-Selektin an vital entstandenen Petechien, massive Congestion der Gefäße und Rupturstelle 45

Abbildung 8 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von P-Selektin an postmortal entstandenen Gefäßläsionen 46

Abbildung 9 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung (CLSM) von P-Selektin an einer unverletzten Konjunktiva mit lokaler Entzündungsreaktion 47

Abbildung 10 Negativkontrolle 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Gruppe I=Kontrolle (n=19) 20

Tabelle 2 Gruppe II=Artefakte (n=12) 21

Tabelle 3 Gruppe III=Petechien positiv (n=65) 22

Tabelle 4 Primär- und Sekundärantikörper 26

Tabelle 5 Endotheliale Gefäßreaktionen bei VCAM-1 (Lichtmikroskopie) 33

Tabelle 6 Endotheliale Gefäßreaktionen bei P-Selektin (Lichtmikroskopie) 35

Tabelle 7 Endotheliale Gefäßreaktionen bei P-Selektin (Fluoreszenzmikroskopie) 38

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arterien
bzw.	beziehungsweise
BSA	Bovine Serum Albumin
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
ELAM-1	endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1
et al.	und andere
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilo Dalton
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 ÜBERLEGUNGEN ZUR PATHOGENESE KONJUNKTIVALER PETECHIEN IM HISTORISCHEN ÜBERBLICK

Konjunktivalen Stauungsblutungen kommt in der rechtsmedizinischen Praxis besondere Aufmerksamkeit zu, treten sie doch im Zusammenhang mit mechanischer Gewalteinwirkung gegen den Hals auf. Im 19. Jahrhundert vertrat der französische Pathologe Auguste Ambroise Tardieu die Ansicht, petechiale Blutungen in den Augenbindehäuten seien allein durch die Asphyxie bedingt. Hierunter verstand er den drohenden Erstickungszustand in Folge eines Absinkens des Sauerstoffgehaltes und/oder einer Kohlenstoffdioxid-Anreicherung im Blut. Petechien seien folglich als pathognomisch dem Erstickungstod zuzuordnen.

Diese Annahme blieb jedoch nicht unwidersprochen. Von Hofmann betonte, dass sich Ecchymosen unter dem Einfluss der Blutschwere nicht nur vergrößern könnten, sondern dass auch als Folge des Drucks der Blutsäule vorher unversehrte Kapillaren bersten würden und somit neue Blutungen entstünden, die von vital entstandenen Ecchymosen nicht zu unterscheiden seien [92, 93]. Ecchymosen, zu seiner Zeit definiert als punktförmige, etwa stecknadelkopfgroße Stauungsextravasate, die als Folge einer Blutstauung im venösen System und anschließender Zerreißung kleinerer Gefäße mit Blutaustritt ins umliegende Gewebe entstehen, sind mit der heutigen Definition von Petechien gleichzusetzen [11, 23].

Von Hofmanns Annahme wurde durch eine Versuchsreihe Ende des 19. Jahrhunderts unterstützt. In dieser wurden kurz vor der Geburt intrauterin und kurz nach der Geburt verstorbene Kinder über einige Tage an den Beinen aufgehängt, wobei in den ersten Stunden bis Tagen punkt– bzw. strichförmige Blutungen in den Konjunktiven zu beobachten waren, die sich bei zunehmender Hypostase noch vergrößerten [35]. Auch wurde immer wieder über Blutflecken in unterschiedlicher Form und Größe an Hals und Gesicht berichtet, wenn Leichen

in Bauchlage oder mit über dem Bettrand herabhängendem Oberkörper gefunden wurden [35, 92, 93]. Abgesehen von Lagerungsartefakten und ihrem Auftreten im Zusammenhang mit mechanischer Gewalt gegen den Hals wurden solche Petechien bei verschiedenen anderen nicht natürlichen Todesarten wie Verschüttung, Ertrinken, Erhängen, Alkoholintoxikation aber auch bei natürlichen Todesarten beobachtet [85]. Zudem traten sie offensichtlich ebenso beim Lebenden auf z.B. im Status epilepticus, bei schwerem und anhaltendem Erbrechen, Husten, Niesen, respiratorischem Stridor, Bronchialasthma, Krupp und Pressvorgängen bei der Entbindung [10, 35]. Sie sind also keineswegs nur bestimmten Erstickungsformen eigen.

Weitere Untersuchungen wurden in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts an einem rechtsmedizinischen Untersuchungsgut (n=484) vorgenommen, wobei die aufgetretenen Petechien und die Todesursachen protokolliert wurden [10]. Bei Erwürgen und Erdrosseln waren ausnahmslos Petechien festzustellen. Beim Bolustod, Aspirationstodesfällen und Ertrinken traten sie bei 13 Prozent der untersuchten Fälle auf. Bei den zur Untersuchung gelangten sechs reinen Erstickungstodesfällen, wobei es sich um Verschluss der Atemwege durch Hineindrücken des Kopfes in eine weiche Unterlage und Ersticken in einer Plastiktüte handelte, wurden aber keine Petechien entdeckt. Somit war die Annahme, die Aspyhxie sei die alleinige Ursache für die Entstehung der petechialen Blutungen, nicht zu tragen, die rein asphyktische Verursachungstheorie nicht aufrechtzuerhalten. Als gemeinsamer Faktor war bei allen Todesursachen oder Zuständen ein venöser Rückstau im Hals-Kopfbereich zu benennen, entweder bei Kompression des Halses oder bei fortgeleiteten Veränderungen der Drücke im intraabdominellen bzw. intrathorakalen Raum. Das Fehlen von Petechien bei Thoraxkompression, welches ebenfalls beobachtet werden konnte, wäre z.B. durch Kompression des linken Ventrikels und Sistieren des cardialen *Outputs* zu erklären [22]. Die in Einzelfällen bei reinen Erstickungstodesfällen gerade auch bei älteren Opfern auftretenden Petechien können bei hohem Bluthochdruck, einem fragilen Gefäßsystem, unelastischen Begleitgeweben und einem erhöhten cardialen Output durch einen ansteigenden venösen Druck beim Ankämpfen oder Schreien gegen den Widerstand der verschlossenen äußeren Atemwege im Sinne eines Valsalva-Effektes erklärt werden. Das Fehlen von Petechien in den

Konjunktiven bei der Mehrzahl der Ertrinkungstodesfälle sei durch hohe Außendrücke, welche dem Gewebsdruck entgegenwirken, zu begründen [22].

Andere Autoren diskutierten eine Kombinationstheorie, wobei neben den genannten mechanischen Komponenten ein durch Sauerstoffmangel bedingter Zellschaden unbedingt erforderlich sein soll. Nach lichtmikroskopischen Serienschnittuntersuchungen an Stauungsblutungen stellte man die Vermutung an, dass eine Diapedeseblutung das Korrelat der petechialen Blutung sei, allerdings ohne tatsächlich einen solchen Erythrozytenaustritt eindeutig beobachtet zu haben [40]. Hier solle unter Diapedese das Auseinanderweichen der Endothelien als Folge der hypoxischen Schädigung durch Stauung und Gewebsazidose verstanden werden, wobei der Blutaustritt dann durch diese Poren erfolge. Eine solche Erythrodiapedese habe man bereits elektronenmikroskopisch am Kapillarsystem zeigen können [40]. Als Untermauerung der Kombinationstheorie wurden Fälle mit Reanimation angeführt. Hierbei wurde angenommen, das Gefäßendothel werde beim Sterbenden zunehmend geschädigt, die Druckerhöhung bei der Reanimation bringe dann die Blutung hervor. Somit bestehe eine Verbindung zwischen Asphyxie und Blutung. Diese Begründung wurde aber von anderer Seite als nicht stichhaltig zurückgewiesen, da die Todesursachen alle auch ohne Reanimation mit Petechien vergesellschaftet waren [63, 64]. Zudem wurden Petechien bei schweren Traumen (z.B. Thoraxkompression bei Eisenbahnunfall) in Bruchteilen von Sekunden produziert, wobei hier die Sauerstofftoleranz der Endothelien in keiner Weise überschritten wird. Von 79 überlebenden Strangulationsopfern wiesen 14 Petechien auf, wobei eine Hälfte davon eine Bewusstlosigkeit als Zeichen des gravierenden Sauerstoffmangels gezeigt hatte, die andere Hälfte aber nicht bewusstlos geworden war. Auch andere Untersuchungen am Lebenden, bei denen gesunde Probanden in kopfüber hängender vertikaler Position in den ersten zehn bis zwanzig Sekunden 80 Prozent des maximalen intraokulären Drucks erreichten und nach einer Minute Hyperämie und Petechien zeigten, sprechen gegen eine wesentliche Mitbeteiligung eines hypoxischen Zellschadens [25]. Nach einer Minute war zudem bei keinem der Probanden eine Hypoxie feststellbar. Wenn man diese Feststellungen würdigt, kommt dem geforderten zusätzlichen hypoxischen Endothelzellschaden keine ausschlaggebende pathogenetische Rolle zu.

Luke und Bschor brachten Petechien im Bereich des Kopfes in Zusammenhang mit dem ansteigenden Gefäßdruck als Folge einer Kompression im Hals- und Nackenbereich [10, 58]. In einem 1967 durchgeführten Experiment fand Luke heraus, dass sich nach Anlage eines Verbandes um den Hals bereits vorhandene Petechien, insbesondere in den Konjunktiven, gefolgt von Gesichts- und Kopfhaut noch weiter verstärkten. So wurde auch die Vermutung geäußert, dass der Druck auf die Venen größer sei als auf die arteriellen Gefäße. Bschor führt aus, dass der venöse Rückstrom bei der Halskompression unterbunden werde, während der arterielle Zufluss erhalten bliebe. Hierbei überschreite dann der Druck in den venösen Kapillaren den physiologischen Kapillardruck von zehn Zentimeter Wassersäule. Als Folge reißen die Gefäße und es komme hieraus dann zur Blutung [10]. Nach Grellner und Madea seien petechiale Blutungen an Haut und Schleimhäuten des Kopfes überwiegend die Folge eines intrakapillären Druckanstiegs mit Zunahme des von innen nach außen gerichteten transvaskulären Druckgradienten [59, 60]. Dort, wo der hydrostatische Druck den Gewebedruck am schnellsten übersteigt, nämlich im lockeren Gewebe der Augenbindehäute, sei am ehesten mit dem Auftreten der Blutungen zu rechnen. In den strafferen Geweben des Gesichts hielten die Gefäße noch länger den veränderten Druckverhältnissen stand. Co-Faktoren, die zur Genese der Petechien beitragen sollen, seien in Lebensalter, Körpermasse und Herzgewicht zu finden [62, 63].

Nach empirischen Erhebungen, experimentellen Untersuchungen und den Beobachtungen aus der rechtsmedizinischen Praxis war theoretisch eine rein mechanische Genese von Petechien anzunehmen [22]. Mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie konnte nunmehr auch das pathomorphologische Korrelat der konjunktivalen Petechie gesichert werden. Dieses besteht in multiplen Rupturen von maximal gestauten Kapillaren und Venolen. Die konjunktivale Petechie ist demnach als Rhexis-Blutung identifiziert und die mechanische Genese somit auch von pathomorphologischer Seite untermauert [48].

1.2 Die Konjunktiva: Anatomie und Funktion

Der etwa 7,5 g schwere, beim Erwachsenen circa 24 mm lange Bulbus oculi liegt geschützt in der knöchernen Orbita. Er wird in seiner Lage gehalten von vier geraden und zwei schrägen Augenmuskeln sowie dem nasal hinten eintretenden Nervus opticus. Der Bulbus selbst ist von einer sehr lockeren bindegewebigen Hülle, der Tenon Kapsel, umgeben. Sie umgibt im vorderen Bereich auch die Augenmuskeln. Der weitere Orbitaraum ist von lockerem Binde- und Fettgewebe ausgefüllt. In ihm verlaufen Nerven und Gefäße. Nach vorn ist die Orbita durch die Bindehaut abgeschlossen [33, 83].

Die Bindehaut des Auges ist eine schleimhautähnliche Fortsetzung der äußeren Haut und stellt eine mechanische Barriere für von außen kommende infektiöse Keime dar. Sie erstreckt sich als Konjunktiva bulbi vom Limbus corneae zur oberen und unteren Übergangsfalte als Fornix konjunktivae und geht dort als Konjunktiva palpebrarum und Konjunktiva tarsi sowohl auf die Innenseite der Lider als auch der Tarsi über. Sie ist transparent, so dass die Lederhaut unter der Konjunktiva bulbi sowie die Meibom Drüsen unter der Konjunktiva tarsi sichtbar sind. Während die Konjunktiva tarsi eine feste Verbindung mit dem Tarsus bildet, ist die Konjunktiva bulbi nur lose mit ihrer Unterlage verbunden und frei verschieblich. Die obere und untere Übergangsfalte sind stark aufgefältelt und dienen als Reserve für extreme Augenbewegungen. Im inneren Lidwinkel befindet sich die Plica semilunaris, eine Schleimhautduplikatur. Sie ist das Rudiment der Nickhaut aus der Phylogenese, die im Tierreich als zusätzlicher Schutz des Auges dient und sich reflektorisch von der nasalen Seite her vor den Bulbus schieben kann. Nasal davon liegt die Caruncula lacrimalis, ein hautähnliches Tränenwärzchen, welche vereinzelt Haare und Drüsen besitzt [84].

Die Konjunktiva bulbi trägt ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel mit Becherzellen. Diese bilden ein schleimiges Sekret zur Anfeuchtung des Auges, verleihen ihm somit eine glänzende Oberfläche und stellen einen wesentlichen Bestandteil des präkornealen Tränenfilms dar. Die tarsale Bindehaut besitzt ein mehrschichtiges Zylinderepithel und ist reich an follikelähnlichen Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen. Weiterhin

sind auch Makrophagen und Antigen-präsentierende Langerhanszellen anzutreffen. Zusätzlich sind unspezifische antimikrobiell wirksame Substanzen vorhanden [69]. Sowohl die Substantia propria als auch das darunter liegende episklerale Gewebe bestehen aus stark vaskularisiertem Bindegewebe mit vielen Fibrozyten, Lymphgefäßen und Nervenfasern. Im Epithel der Konjunktiva sind fünf strukturell unterschiedlich aufgebaute Zellphänotypen, vermutlich als Ausdruck einer funktionellen Spezialisierung wie Resorption, Proliferation und Synthese von Abwehrstoffen, anzutreffen. Aufgrund der reichlich vorhandenen und in der Umschlagsfalte gut geschützten Stammzellen und der guten Vaskularisierung besitzt das Bindehautepithel und auch das darunter liegende Stroma ein ausgesprochen gutes Wundheilungspotential, was eine schnelle Expression von Wundheilungsparametern erwarten lässt [45].

Die arterielle Versorgung der Konjunktiva palpebrarum wird von den Ästen der Aa. palpebrales mediales und laterales gewährleistet. Die Arterien der Konjunktiva bulbi hingegen stammen aus den Aa. ciliares anteriores. Hierbei handelt es sich um Äste der Arterien der vier geraden Augenmuskeln. Sie bilden am Hornhautrand ein Randschlingennetz. Sie lassen sich leicht mit der Bindehaut verschieben und durch Druck entleeren. Die etwas stärkeren Venen verlaufen meist unabhängig von den zugehörigen Arterien [81]. Alle Blutgefäße der Konjunktiva zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, sich bei unterschiedlichen Reizen rasch und stark erweitern zu können (siehe Abbildung 1). Es kommt zur Absonderung von Exsudat und Blutzellen in das konjunktivale Stroma und damit sowohl zu einer entzündlichen Schwellung als auch zu einer leukozytären Infiltration. Die hohe Reagibilität der Bindehaut lässt sich mit den vielen und weit verzweigten sensiblen Nerven in ihrem Stroma und in der Cornea erklären. Dieser Aufbau macht die Konjunktiva zu einem typischen Ort immunologischer Reaktionen [80].

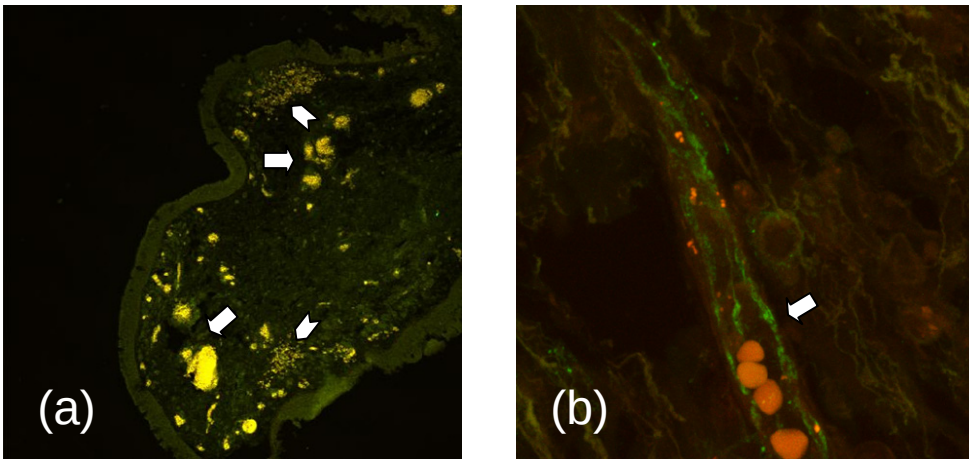

ABBILDUNG 1 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON KONJUNKTIVA UND KAPILLARGEFÄß

(a) Übersicht konjunktivale Petechien, gefüllte und dilatierte Gefäße der Endstrombahn (➡), Blutextravasationen (➡). 78 Jahre, weiblich, Kompression der Trachea in hilfloser Lage. Leica TCS SP, HL PL FLUOTAR, 10,0 x 0,3; zoom, 1; $(100\mu m)^2$ x 9µm

(b) Konjunktiva, Kapillargefäß (➡), CD31/FITC, normaler Befund. 82 Jahre, weiblich, Polytrauma. Leica TCS SP, PL APO, 100,0 x 1,40 OIL; zoom, circa 1,48, $(67\mu m)^2$ x 6µm

1.3 Die frühe Wundheilungsreaktion an der Bindehaut und die endothelialen Adhäsionsmoleküle

In der Initialphase der Wundheilung kommt es bei einem Trauma mit Gefäßverletzung, die wie nachgewiesen das pathomorphologische Korrelat der konjunktivalen Stauungsblutung darstellt, zum Eintritt von Blutplasmakomponenten, Thrombozyten und Leukozyten in das Wundgebiet (siehe Abbildung 1). Es folgt die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die Akkumulation von Fibrin und Fibronektin zur Bildung eines Koagels. Nach einer solchen Schädigung an den konjunktivalen Endothelien ist bei vitaler Entstehung die Initialisierung von Wundheilungsprozessen zu vermuten, möglicherweise der Verletzung im Rahmen einer OP mit sterilen Kautelen nicht unähnlich. Nach chirurgischen Erfahrungen spielt bei der sterilen Gefäßverletzung in erster Linie und schon im Minutenbereich P-Selektin, später aber auch L-Selektin bei der Wanderung der Leukozyten in das Wundgebiet eine Rolle. E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 sollen hier, im Fall der sterilen Gefäßverletzung unter chirurgischen Kautelen keinen Einfluss besitzen [43]. An

unsterilen Hautwunden aus Obduktionsgut und chirurgischem Exzisionsmaterial hat sich insbesondere das Adhäsionsmolekül P-Selektin als aussagekräftig erwiesen, wobei sein frühestes Auftreten mit drei Minuten beschrieben wurde [18, 19, 20]. VCAM-1 hingegen konnte nach frühestens drei Stunden, dafür aber bis zu dreieinhalb Tage nach Verletzung nachgewiesen werden [19, 20]. Mit steigendem Wundalter gewinnt der Wachstumsfaktor VEGF zunehmend an Bedeutung. Es wird vermehrt ab dem vierten Tag, signifikant jedoch erst zwischen dem siebten und vierzehnten Tag exprimiert [38].

1.3.1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

VCAM-1 ist ein 110-kDa-Protein, welches von Gefäßendothelzellen, Gewebs-Makrophagen, dendritischen Zellen, Knochenmark-Fibroblasten und Myoblasten präsentiert wird. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Antikörper-Molekülen gehört es zur Immunglobulin-Superfamilie.

Es spielt als Adhäsionsmolekül und Kostimulans eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenemigration aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe und ist somit an der Regulation inflammatorischer Prozesse wesentlich mitbeteiligt. Es unterstützt durch seine Interaktion mit dem Zelloberflächen-Heterodimer Integrin-$\alpha 4\beta 1$, dem so genannten leukocyte very late antigen-4 (VLA-4) die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten, natürlichen Killerzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Bekanntermaßen interagiert es aber auch schwach mit dem eng verwandten Integrin-$\alpha 4\beta 7$ auf Leukozyten [55, 56, 73]. Die genannte Bindung an die Integrine auf der Leukozytenoberfläche führt zur festen Anheftung der Abwehrzellen an das Endothel. Dieses gilt als Voraussetzung für die Auswanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen. Nachdem sich die Leukozyten entlang der Endothelien zu einer endothelialen Zellgrenze bewegt haben, verlassen sie das Gefäß im Sinne einer echten Diapedese. Bevorzugte Orte der Leukozyten–Emigration sind ganz besondere, mit charakteristischen Adhäsionsmolekülen ausgestattete, postkapilläre Venolen (HEV), die sich in allen sekundären Lymphgeweben, entzündlichen Herden und auch in den Augenbindehäuten befinden. VCAM-1 ist hauptsächlich an aktivierten Endothelzellen vorhanden, wird aber auch von

Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen, Knochenmarksfibroblasten und Myoblasten exprimiert [13, 61, 94].

Es soll generell an allergischen Reaktionen (Aktivierung von Eosinophilen über Interaktion VLA-4/VCAM) beteiligt sein, da es durch IL-4 auf Endothelzellen aufreguliert wird [76]. Dieser Nachweis konnte jedoch für allergische Entzündungsreaktionen an der menschlichen Konjunktiva nicht erbracht werden [39]. Zudem wird es bei einem umfassenden Spektrum inflammatorischer Pathologien exprimiert einschließlich der Abstoßung kardialen Transplantationsgewebes, bei atherosklerotischen Läsionen, bei der Multiplen Sklerose, der arthritischen Synoviitis und einer Vielzahl entzündlicher Hauterkrankungen [73]. Auch ein bestehender Diabetes mellitus wird mit einer ansteigenden Prävalenz endothelialer Dysfunktion in Verbindung gebracht [1]. Setzt man Endothelzellen über einen Zeitraum von circa 24 Stunden hohen Glucosekonzentrationen aus, kann bereits eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und ELAM-1 verzeichnet werden [1]. Die Induktion von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche gehört somit zu den ersten Schritten in der durch hohe Glucosekonzentration hervorgerufenen endothelialen Dysfunktion. In den Fällen mit bestehendem Diabetes muss aufgrund dessen eine gesonderte Auswertung der Ergebnisse erfolgen. Weiterhin wurde in einer Studie von Hansen *et al.* die Wirkung von Wachstumshormonen auf endotheliale Adhäsionsmoleküle und auf das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) untersucht [36]. Dabei fanden sie heraus, dass bei gesunden Probanden, die mit Wachstumshormonen behandelt wurden, eine im Serum signifikant erhöhte Expression von VCAM-1 ($p < 0,01$) festzustellen war. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass Wachstumshormone die Expression von VCAM-1 indirekt durch Modulation von weiteren zirkulierenden Faktoren stimulieren. Die Einnahme von Wachstumshormonen zählt hiermit ebenso zu den positiven Determinanten der VCAM-1 Expression und muss infolgedessen Fall bezogen diskutiert werden.

VCAM 1 soll zudem in einer löslichen Form (sVCAM-1) vorliegen [55, 56]. Lösliche VCAM-1-Level wurden hierbei auch im Serum Gesunder nachgewiesen [29]. Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 weisen erhöhte Serumspiegel löslicher Adhäsionsmoleküle als Ausdruck der Endothelaktivierung auf, so auch

Patientinnen, die orale Kontrazeptiva einnehmen, denn auch diese erhöhen nach aktuellen Untersuchungen die lösliche VCAM-1-Konzentration [86]. Weiterhin können erhöhte sVCAM-1 Konzentrationen bei verschiedenen Krankheiten entdeckt werden:

- Krebs [3]: ovarial, gastro-intestinal, renal, Blasenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphom [30]
- Autoimmunkrankheiten: systemische Sklerose [34], systemischer Lupus erythematodes [72], rheumatoide Arthritis [30]
- Infektionen: Sepsis, Meningitis, Malaria
- Entzündungen: Vasculitis [30], primäre biliäre Zirrhose [53], Wegener Granulomatose [72]
- sonstige Krankheiten: eingeschränkte Nierenfunktion [29], Hämodialyse, Hyperthyreose, Nierentransplantat [30]

Der Antikörper VCAM-1 (CD106) markiert Zellen, die das vascular cell adhesion molecule-1 exprimieren, einschließlich Endothelzellen, follikulärer dendritischer Zellen, interdigitierender Zellen und Synoviozyten.

An der menschlichen Hautwunde aus Obduktionsgut und chirurgischem Wundexzisionsmaterial wurde das Adhäsionsmolekül frühestens drei Stunden und spätestens dreieinhalb Tage nach der Verletzung nachgewiesen [19, 20]. Andere Untersuchungen geben die früheste immunhistochemische Nachweisbarkeit von VCAM-1 mit 30 Minuten, die regelmäßige Nachweisbarkeit mit eineinhalb Stunden nach Verletzung an menschlicher Haut an [59, 60]. Unter sterilen Bedingungen konnte bei Inzision der Konjunktiva keine Veränderung der VCAM-1-Expression beobachtet werden [43].

1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der vascular endothelial growth factor (VEGF) gehört zur Familie der platelet-derived-growth-factors (PDGF). Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 45kDa und weist eine Homologie von 24 Prozent zur B-Kette des PDGF auf.

Insgesamt existieren vier Isoformen des VEGF, die beiden kleineren VEGF-Isoformen VEGF 165 und VEGF 121 stellen sezernierte Proteine dar, welche als weit verteilte Agenzien wirken, während die beiden größeren, VEGF 189 und VEGF 206, zellgebunden bleiben. Das hier untersuchte VEGF 121 kann im Zytoplasma, auf der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix immunhistochemisch lokalisiert werden.

In der Hauptsache sind die Endothelzellen im Hinblick auf die Sekretion von und in der Antwort auf VEGF involviert [71]. VEGF wird aber auch von Epithelzellen, Makrophagen sowie Fibroblasten produziert [54]. Nach Arbeiten von Mor *et al.* seien auch T-Lymphozyten fähig, VEGF zu sezernieren, wenn sie durch spezifische Antigene, Interleukin-2 oder aber auch durch Hypoxie stimuliert werden [54]. Somit könnten aktivierte T-Zellen an einer verstärkten Angiogenese wesentlich mitbeteiligt sein, indem sie VEGF an inflammatorische Bereiche lieferten. VEGF wiederum könne die proinflammatorische T-Zell-Differenzierung verstärken. Außerdem induziert der Wachstumsfaktor VEGF die Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen und wirkt chemotaktisch auf Monozyten [15, 32]. Er steigert die Vasopermeabilität und fördert weiterhin die Koagulation im Blut [15]. VEGF wird vermehrt bei Heilungsprozessen mit gesteigerter Angiogenese, in heilenden Wunden und bei chronisch entzündlichen Krankheiten wie beispielsweise bei Psoriasis oder bei Rheumatoider Arthritis exprimiert [21, 27].

An menschlichen Hautwunden konnte VEGF vereinzelt bereits Stunden nach Verletzung, häufiger jedoch mit zunehmendem Wundalter ab vier Tagen und signifikant zwischen dem siebten und vierzehnten Tag nachgewiesen werden [38]. Es liegen Ergebnisse vor, dass VEGF bis einschließlich 21 Tage nach Wundenstehung beobachtet werden kann [38].

1.3.3 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

PDGF ist eines der zahlreichen Proteine, welches für die Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung verantwortlich ist. Es spielt eine wesentliche Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation, der Migration sowie der Angiogenese. PDGF wirkt mitogen auf Zellen im Bereich einer Wunde und

fördert auf diesem Wege die endotheliale Proliferation [31, 89, 95]. Der Wachstumsfaktor wird hauptsächlich von Thrombozyten, aber auch von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Megakaryozyten, vaskulären Muskelzellen, Gliazellen und anderen Zellarten produziert [24]. Die Substanz ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 24kDa, welches variabel aus den Peptidketten A und/oder B zusammengesetzt sein kann. Daraus resultieren die drei Isoformen AA, AB und BB. Die häufigste Isoform in humanen Thrombozyten ist AB mit 65-70 Prozent, gefolgt von BB mit 20-30 Prozent.

Es existieren zwei spezifische PDGF-Rezeptoren, α und β, welche unmittelbar an der Zellmembran lokalisiert sind, wobei die ß-Rezeptoren zahlenmäßig überwiegen [47]. An den α-Rezeptor binden alle drei Isoformen des PDGF. Der β-Rezeptor hingegen bindet nur an die B-Kette, das BB-Homodimer folglich mit hoher und das AB-Heterodimer mit geringerer Affinität. Das AA-Homodimer wird nicht gebunden [14]. PDGF wirkt auf parakrinem oder autokrinem Wege chemotaktisch und mitogen auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Monozyten, Neutrophile, Mesenchym- und Entzündungszellen. Außerdem wurden zahlreiche Effekte auf die extrazelluläre Matrix beschrieben. So stimuliert PDGF zum Beispiel die Produktion von Hyaloronsäure, Fibronektin und Kollagenase. Die vermehrte Expression von PDGF wird mit verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Arteriosklerose und malignen Prozessen in Verbindung gebracht.

Hinsichtlich der Nachweisbarkeit von PDGF an Hautwunden liegen derzeit keine Untersuchungsergebnisse vor.

1.3.4 P-Selektin (CD62-P-Antigen)

P-Selektin ist ein 140kDa großes transmembranales Glykoprotein und gehört zusammen mit CD62E (E-Selektin) und CD62L (L-Selektin) zur Familie der Selektine [49, 65]. Selektine fördern im Allgemeinen inflammatorische Reaktionen, indem sie die Rekrutierung der Leukozyten erleichtern [96].

In inaktiven Endothelzellen wird P-Selektin in den so genannten Weibel-Palade bodies zusammen mit dem von Willebrand Faktor (vWF) gespeichert [6, 17, 66].

Außerdem wird es auch intrazellulär in Megakaryozyten und Thrombozyten, umgeben von der Membran sekretorischer alpha-Granula, aufbewahrt [65, 66, 67, 68, 87]. In dieser Form vorliegendes P-Selektin induziert in der Immunfärbung mit Anti-CD62P keine detektierbare Reaktion. Werden in Folge einer Schädigung Blutplättchen und Endothelzellen im Rahmen der Wundheilungsprozesse durch chemotaktische Agonisten wie Thrombin, Histamin, Lipopolysaccharide (LPS) oder Sauerstoffradikale aktiviert, verschmelzen die Speichergranula umgehend mit der Plasmamembran der Zelle, die nunmehr CD62P innerhalb von Minuten auf ihrer Oberfläche exprimiert [37, 57, 65, 74, 75, 87]. Dies führt zur Adhäsion von Leukozyten, die bereits nach circa einer Stunde wieder beendet ist [37]. Die Expression ist nur von kurzer Dauer und erreicht ihr Maximum bereits nach zehn Minuten. P-Selektin ist daher ein wichtiger Marker bei kurzen Überlebenszeiten [97].

Eine zusätzliche Synthese des Adhäsionsmoleküls wird durch Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder den Tumornekrosefaktor α (TNF-α) innerhalb der ersten zwei Stunden nach Aktivierung erreicht. Das Antigen ist in diesem Zeitraum der immunhistochemischen Detektion zugänglich, die Verteilung von P-Selektin kann wiederum Aufschluss über die verschiedenen Stadien der Aktivierung geben. Aus physiologischer Sicht dient CD62P so, auf den Oberflächen von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert, als Rezeptor für neutrophile Granulozyten und Monozyten [67]. Der Hauptligand für P-Selektin ist PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1), der generell auf den Leukozyten gefunden werden kann. Dieser Ligand bindet an das an der Gefäßwandauskleidung haftende P-Selektin. Die Leukozyten scheinen im Rahmen solcher Bindungsprozesse somit an der Gefäßinnenwand entlang zu rollen, was mit dem Begriff *rolling* beschrieben wird [51, 91]. P-Selektin soll weiterhin eine bedeutende Rolle in der Koagulation des Blutes einnehmen und so zur Entstehung von Thrombosen beitragen [26, 78]. Eine gesteigerte P-Selektin–Expression bei Entzündungen kann außerdem zu Gewebszerstörungen und Atherogenese beitragen.

Das Adhäsionsmolekül P-Selektin kann auch als lösliche Form im Blut vorliegen. Bei der Regulation gelten die Anzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen sowie spezifischer Antigenkontakt bei prädisponierten

allergischen Personen als positive, orale Kontrazeptiva, Glucose, Hydrocortison und TNF-alpha als negative Determinanten der P-Selektin-Konzentration [39, 43, 79]. Heparin kann sich an das P-Selektin–Molekül anhängen und so die Kontaktaufnahme mit seinem Rezeptor unterbinden. Die inflammatorische Wirkung von P-Selektin kann so unterdrückt werden [28, 39]. Lösliche P-Selektin-Konzentrationen im Blut unter physiologischen Bedingungen konnten bereits nachgewiesen werden [79]. Bei Männern in der Altersgruppe von 18 bis 55 Jahren wurden signifikant höhere P-Selektin-Level als bei gleichaltrigen Frauen gemessen. Bei Kindern im Alter von vier bis siebzehn Jahren konnten solche geschlechtsspezifischen Unterschiede in der P-Selektin-Konzentration nicht festgestellt werden. Mit zunehmendem Alter jedoch sinkt der P-Selektin–Spiegel im Blut der Kinder signifikant ab [79].

Die Literatur macht bezüglich der Nachweisgrenze von P-Selektin unterschiedliche Angaben. Mit von Bedeutung ist hierbei die Lokalisation des Endothels. Bei der allergischen Inflammation der menschlichen Konjunktiva wird eine ansteigende Expression von P-Selektin innerhalb der ersten 60 Minuten nach Allergenexposition verzeichnet [39]. Sowohl in vitro- als auch Tierversuche weisen darauf hin, dass diese Hochregulation durch Mastzellaktivierung induziert wird [42, 44, 50, 70]. Das aus den Mastzellen freigesetzte Histamin wiederum unterstützt sowohl in vitro als auch in vivo durch eine ansteigende Expression von P-Selektin das Rollen der Leukozyten [2, 41, 46]. Bei tierexperimentellen Untersuchungen zur Rolle von P-Selektin bei Uveitis ergab sich eine biphasisch verstärkte Expression an den Endothelien im Entzündungsbereich. Die stärksten Aktivitäten konnten 15 Minuten und eine bis vier Stunden nach künstlich induzierter Entzündung beobachtet werden [88].

Gemäß Untersuchungen an Hautwunden aus chirurgischen und rechtsmedizinischen Untersuchungskollektiven wurde das früheste Auftreten einer positiven Reaktion nach circa drei Minuten, das späteste hingegen nach sieben Stunden berichtet, wobei bei der Einschätzung der Aktivität eine Schwelle von circa 15 Prozent positiver Gefäße zu berücksichtigen war [18, 19, 20]. Nach einem Intervall von zwölf Stunden nach Verletzung nahm die Farbintensität und somit die Nachweisbarkeit jedoch bereits signifikant ab [18]. Auch im Rahmen augenchirurgischer Studien wurden erhöhte P-Selektin-

Aktivitäten in der operierten Konjunktiva festgestellt, wobei auch hier eine Schwelle von 15 Prozent zu berücksichtigen war [43].

1.4 Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zeichnet sich gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie durch eine erhöhte optische Auflösung aus. Es besteht, bei einer Tiefenschärfe von circa 0,5µm die Möglichkeit optische Schnitte mit einem definierten Abstand durch ein Präparat zu legen. Die Zusammensetzung dieser optischen Serienschnitte wiederum ermöglicht die dreidimensionale Rekonstruktion aus einem zweidimensionalen Datensatz. Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, in der das Objektfeld als Ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie durch das Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes. Das Einbringen einer zweiten Lochblende in die aufnehmende Optik bewirkt eine erhebliche Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des Streulichtes aus nicht im Fokus liegenden Ebenen. Es sind somit umfangreiche digitale Bildbearbeitungsmöglichkeiten gegeben [16, 52, 90].

1.5 Ziele der Arbeit

Werden Petechien bei einer Leiche mit ursprünglicher Bauch- und/oder Kopftieflage bei unklarem Halsbefund angetroffen, stellt sich von Alters her die Frage nach der Vitalität. In der Vergangenheit geprüfte differentialdiagnostische Kriterien, wie z.B. lichtoptische Darstellung des Gerinnungszustands in der Blutung und eine besondere Stauung der Gefäße vermögen diese Frage nicht und schon gar nicht mit der im Strafrecht erforderlichen Sicherheit zu klären.

Wie bereits einleitend dargestellt, sind Petechien in den Augenbindehäuten aufgrund einer Erhöhung des Venendrucks im Halskopfbereich als rein

mechanisch bedingt anzusehen. Nachweislich handelt es sich bei dem pathomorphologischen Korrelat der konjunktivalen Petechie um multiple Gefäßrupturen im Bereich massiv geweiteter Kapillaren und postkapillärer Venolen, wobei diese aufgrund der schwachen Wand und der Lockerheit des umgebenden Bindegewebes bei venösem Rückstau mit Erhöhung des Venendrucks bersten. Nach einer solchen Schädigung ist bei vitaler Verletzung die Initialisierung von Wundheilungsprozessen zu vermuten.

Anhand der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (P-Selektin, VCAM-1, VEGF und PDGF) sollte geprüft werden, ob verlässliche Aussagen zur Vitalität der Gefäßverletzungen, gegebenenfalls auch zeitliche Ein- und Zuordnungen (Wundaltersbestimmung) getroffen werden können.

Die untersuchten Proteine treten im Rahmen der Wundheilungskaskade auf. Aufgrund ihrer Nachweisbarkeit bereits zu frühen Zeitpunkten nach Initialisierung von Wundheilungsprozessen zeigten sich insbesondere P-Selektin und VCAM-1 als Erfolg versprechend.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Autolysezeichen

Autolysezeichen an der Leiche wurden eingeteilt in:

[Ø] = keine Autolyse

[+] = beginnende Grünfäulnis mit durchschlagenen Venennetzen

[++] = fortgeschrittene Fäulnis

[+++] = starke Fäulnis mit Madenbefall

2.1.2 Zuordnung der Gruppen

Das Ausgangsmaterial der vorliegenden Arbeit stellten prospektiv **96** Obduktionsfälle aus dem hiesigen rechtsmedizinischen Sektionsgut der Jahre 2001-2007 dar (siehe Tabelle 1-3).

Die Leichenliegezeit, also die Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Obduktion, wurde den Sektionsprotokollen entnommen und betrug insgesamt circa fünf Stunden bis dreizehn Tage, davon am Auffindeort zwischen wenigen Minuten bis zu circa zehn Tagen unter verschiedenen Umwelteinflüssen, später dann wie üblich in der Kühlzelle bei vier Grad Celsius. Die Überlebenszeit wurde entsprechend dem *autoptisch* gesicherten Todesmechanismus und dem aus der Todesursache ableitbaren Sterbeprozess festgestellt. Schilderungen aus Krankenakten und/oder Ermittlungsunterlagen sowie Zeugenaussagen wurden falltypisch hinzugezogen. Die Todesursache wurde *autoptisch* gesichert.

Die insgesamt 96 von uns untersuchten menschlichen Konjunktiven stammten in 67 Fällen von männlichen und in 29 Fällen von weiblichen Personen. Das

individuelle Todesalter der Verstorbenen erstreckte sich von neun bis 90 Jahren.

I. Gruppe=Kontrolle

19 Fälle (**m/w: 13/6; 28-90 Jahre**) mit verschiedenen natürlichen (cardiale, pulmonale, zentrale Ursachen) und nicht natürlichen Todesursachen (Intoxikation, Polytrauma, Ertrinken, typisches Erhängen) mit blanden, blutungsfreien Konjunktiven wurden als Kontrollgruppe untersucht (siehe Tabelle 1). Die Leichenliegezeit, also die Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Sektion, lag zwischen zwölf Stunden und dreizehn Tagen. Die Leichen zeigten Autolysezeichen bis einschließlich Stadium [++]. Ein Leichnam war stark verkohlt.

II. Gruppe=Artefakte

Es kamen **12** Fälle zur Beurteilung (**m/w: 9/3; 12-66 Jahre**), bei denen primär bei der ersten Leichenschau keine Petechien feststellbar waren (siehe Tabelle 2). Die Untersuchung der Bindehäute war hier in üblicher Weise unter Zuhilfenahme einer Pinzette, mit der die Bindehaut gestrafft und in allen Richtungen einsehbar dargestellt wurde, eingangs mit entsprechend negativem Befund durchgeführt worden. Zu Beginn der Obduktion wurde der Leichnam in Bauchlage mit Kopftieflage verbracht. Die hierdurch produzierten Petechien kamen dann als Lagerungsartefakte zur Untersuchung. Die Leichenliegezeit vom Todeszeitpunkt bis zur Obduktion und damit auch gleichzeitig zur Produktion der Petechien betrug zwischen mindestens circa fünf Stunden und maximal sechs Tagen. Autolysezeichen an den Leichen zeigten sich bis einschließlich Stadium [+].

III. Gruppe=Petechien positiv

Diese Gruppe (siehe Tabelle 3) umfasste **65** Fälle (**m/w: 45/20; 9-89 Jahre**). Die Liegezeit betrug circa zwölf Stunden bis zehn Tage. Autolysezeichen an den Leichen wurden bis einschließlich Stadium [++] angetroffen. Hier wurden Konjunktiven gesichert, bei denen Petechien nachzuweisen waren, deren Genese erhöhte Venendrücke im Halskopfbereich zugrunde lagen.

Ausgeschlossen waren Fälle, bei denen direkte Gefäßwandschäden im Rahmen einer Erkrankung, z.B. bei Meningokokkensepsis zu erwarten waren.

In 28 Fällen handelte es sich um natürliche Todesarten verschiedener Ursachen (cardial, pulmonal, central), in 37 Fällen war der Tod im Rahmen eines nicht natürlichen Geschehens eingetreten (Erstickungstodesfälle, Intoxikation, stumpfe Gewalt mit Schädelhirntraumata, Thoraxtrauma, Polytrauma, scharfe Gewalt, Stromeinwirkung, Erfrieren und Schussverletzung). Bei den zehn Erstickungstodesfällen handelte es sich in einem Fall um Erdrosselung, in zwei Fällen um atypisches Erhängen, in einem Fall um Erwürgen, in zwei weiteren Fällen um Strangulation (im einen Fall durch eine Fixierung am Krankenbett, im anderen mithilfe einer Hantelstange und eines Küchenhandtuchs), in einem Fall um eine Halsweichteilkompression, außerdem in einem Fall um eine Kombination aus Würgen, Drosseln und einer vorderen Halskompression als Todesursache, in einem weiteren Fall um eine Kombination aus Schädelhirn-, Thoraxtrauma und Strangulation und in einem Fall schließlich um Ertrinken im seichten Wasser ohne hohe Außendrücke.

Die insgesamt **65** Fälle mit vital entstandenen konjunktivalen Petechien wurden gemäß ihrer Überlebenszeit in Sekunden (n=**15**), Minuten (n=**44**), Stunden/Tage (n=**6**) unterteilt (siehe Tabelle 3).

2.1.3 Untersuchungsgut

TABELLE 1 GRUPPE I=KONTROLLE (N=19)

Alter	Geschlecht	Überlebenszeit	Leichenliegezeit	Todesursache
81	w	Minuten	12 Stunden	Herzbeuteltamponade
34	m	Minuten	1 tag	Intoxikation
37	w	Minuten	1 Tag	Lungenembolie
51	m	Minuten	1 Tag	Lungenembolie
57	m	Minuten	1 Tag	Polytrauma
84	m	Minuten	2 Tage	zentrale Dysregulation
38	m	Minuten	3 tage	typisches Erhängen
45	m	Minuten	3 Tage	Ertrinken
63	m	Minuten	7 Tage	akutes cardiales Pumpversagen
53	m	Minuten	9 tage	Lungenembolie
48	m	Minuten	13 tage	Myokardinfarkt
70	m	Minuten	13 tage	Ertrinken
61	w	Stunden	2 Tage	Verblutung
28	m	Tage	12 Stunden	Myokarditis
47	w	Tage	2 Tage	bakterielle Meningitis
90	m	Tage	2 Tage	zerebrale Blutungen
57	m	Tage	3 tage	Myokardinfarkt
83	w	Tage	3 Tage	Rechtsherzversagen
58	w	Tage	8 tage	Polytrauma

TABELLE 2 GRUPPE II=ARTEFAKTE (N=12)

Alter	Geschlecht	Überlebenszeit	Leichenliegezeit	Todesursache
42	w	Sekunden	1 Tag	Myokarditis
64	w	Sekunden	1 Tag	Herzrhythmusstörungen
12	m	Sekunden	3 Tage	Myokarditis
39	m	Sekunden	3 Tage	Myokardinfarkt
46	m	Sekunden	6 Tage	Myokarditis
41	m	Minuten	05 Stunden	zentrale Dysregulation
64	m	Minuten	08 Stunden	Herzleistungsschwäche
52	m	Minuten	12 Stunden	Myokardinfarkt
28	m	Minuten	1 Tag	Intoxikation
36	m	Minuten	1 Tag	Intoxikation
54	m	minuten	1 Tag	Koronarinsuffizienz
66	w	Minuten	1 Tag	gewalt gegen den Hals

TABELLE 3 GRUPPE III=PETECHIEN POSITIV (N=65)

Alter	Geschlecht	Überlebenszeit	Leichenliegezeit	Todesursache
43	m	Sekunden	1 Tag	Stromeinwirkung
49	m	Sekunden	1 Tag	akuter Herztod
52	m	Sekunden	1 Tag	Myokardinfarkt
81	m	Sekunden	1 Tag	Thoraxtrauma
27	m	Sekunden	2 Tage	Aneurysmaruptur
28	w	Sekunden	2 Tage	Aortenruptur
32	m	Sekunden	2 Tage	Myokarditis
34	m	Sekunden	2 Tage	Schuss
58	m	Sekunden	2 Tage	Myokardinfarkt
67	w	Sekunden	2 Tage	kardiale Dekompensation
23	m	Sekunden	3 Tage	Myokarditis
62	m	Sekunden	3 Tage	kardiale Dekompensation
73	m	Sekunden	3 Tage	kardiale Dekompensation
09	m	Sekunden	4 Tage	Schädelhirn-/ Thoraxtrauma
82	m	Sekunden	5 Tage	Schuss
30	m	Minuten	12 Stunden	Erdrosseln
32	w	Minuten	12 Stunden	Halskompression
38	m	Minuten	12 Stunden	Schädelhirntrauma
47	M	Minuten	12 Stunden	Intoxikation
53	w	Minuten	12 Stunden	Polytrauma
54	w	Minuten	12 Stunden	Intoxikation
73	m	Minuten	12 Stunden	Thorax-/Schädel-hirntrauma mit Strangulation
15	m	Minuten	1 Tag	Grand Mal
20	m	Minuten	1 Tag	Intoxikation/ kardiale Dekompensation
20	w	Minuten	1 Tag	Erwürgen/

				Erdrosseln/ Halskompression
21	m	Minuten	1 Tag	Strangulation/ Schädelhirntrauma
21	m	Minuten	1 Tag	Polytrauma
30	w	Minuten	1 Tag	Erwürgen
33	m	Minuten	1 Tag	Grand Mal
58	w	Minuten	1 Tag	zentrale Dekompensation
69	w	Minuten	1 Tag	Verblutungsschock
72	m	Minuten	1 Tag	Schädelhirntrauma
82	w	Minuten	1 Tag	Polytrauma
15	w	Minuten	2 Tage	Polytrauma
23	m	Minuten	2 Tage	Intoxikation
26	m	Minuten	2 Tage	Intoxikation
27	m	Minuten	2 Tage	Intoxikation
34	m	Minuten	2 Tage	Myokarditis
46	w	Minuten	2 Tage	atypisches Erhängen
49	m	Minuten	2 Tage	Myokardinfarkt
51	m	Minuten	2 Tage	Alkoholintoxikation
54	m	Minuten	2 Tage	Aneurysmaruptur
54	m	Minuten	2 Tage	Schussverletzung
64	m	Minuten	2 Tage	zentrales Herz-Kreislauf-Versagen
65	m	Minuten	2 Tage	Grand Mal
65	m	Minuten	2 Tage	Ertrinken
81	w	Minuten	2 Tage	Polytrauma
24	m	Minuten	3 Tage	Intoxikation
31	m	Minuten	3 Tage	zentrales Herz-Kreislauf-Versagen
32	m	Minuten	3 Tage	Intoxikation
47	m	Minuten	3 Tage	Grand mal
53	w	Minuten	3 Tage	Myokarditis

73	M	MINUTEN	3 TAGE	MYOKARDINFARKT
78	W	MINUTEN	3 TAGE	STRANGULATION
26	M	MINUTEN	5 TAGE	INTOXIKATION
53	M	MINUTEN	6 TAGE	ATYPISCHES ERHÄNGEN
62	W	MINUTEN	6 TAGE	MYOKARDITIS
44	W	MINUTEN	7 TAGE	GRAND MAL
68	M	MINUTEN	10 TAGE	MYOKARDINFARKT
36	M	2 STUNDEN	1 TAG	POLYTRAUMA
60	W	6 STUNDEN	2 TAGE	POLYTRAUMA
81	W	STUNDEN	12 STUNDEN	CARDIALE DEKOMPENSATION
46	M	STUNDEN	1 TAG	PANKREATITIS/ HYPOGLYKÄMIE
89	W	STUNDEN	4 TAGE	PERITONITIS
21	M	10 TAGE	2 TAGE	MYOKARDITIS

2.1.4 Entnahme und Bearbeitung der Proben

Die Konjunktiven wurden postmortal nach der postmortalen Liegezeit mit Hilfe von Pinzette und Schere unter Wahrung der Intaktheit aller Gewebsschichten entnommen. Die Asservierung erfolgte im Rahmen der Obduktion. Die bis zu maximal 0,3cm x 0,3cm großen Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in vierprozentigem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit 2µ/10µ (Licht-/Fluoreszenzmikroskopie) dicken Schnitten auf Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden über Nacht in einem Wärmeschrank (circa 68°C) getrocknet und anschließend mit immunhistochemischen Methoden bearbeitet.

2.1.5 Primär- und Sekundärantikörper

Die Auswahl der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper erfolgte unter dem Aspekt der Routinetauglichkeit. Um dies zu erreichen, wurden stabile, konventionell erhältliche Antikörper ausgesucht, die in der Praxis einfach zu handhaben sind. Hiermit sollte ein anwendungsorientiertes Arbeiten ermöglicht werden.

Als Primärantikörper wurden für die lichtmikroskopisch vororientierenden Untersuchungen **P-Selektin/CD62P** (DAKO; 1:50), **VCAM-1/CD106** (DAKO; 1:50), **VEGF Ab-3/JH121** (Dianova; 1:25) und **PDGFR, alpha Ab-1** (Dianova; 1:10) verwendet. Als Primärantikörper für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dienten **P-Selektin/CD62P** (DAKO; 1:50) sowie **CD31** (DAKO; 1:10) und als Sekundärantikörper **FITC** (DAKO; 1:20). Alle Antikörper sind in Tabelle 4 noch einmal dargestellt.

TABELLE 4 PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Antikörper	Klon	Iso-Typ	Herkunft	Verdünnung	Firma
P-Selektin (Primärantikörper)	1E3	IgG2a, kappa	Maus	1:50	DAKO M 7199
CD31 (Primärantikörper)	JC70A	IgG1, kappa	Maus	1:10	DAKO M 0823
FITC (Sekundärantikörper)	-	-	Kaninchen	1:20	DAKO F 0261
VCAM-1	1.4C3	IgG1, kappa	Maus	1:50	DAKO M 7106
VEGF	JH121	IgG1, kappa	Maus	1:25	Dianova 09081
PDGFR	-	-	Kaninchen	1:10	Dianova 13572

2.1.6 Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrollen dienten für P-Selektin=CD62P (DAKO) und VCAM1=CD106 (DAKO) initial menschliche Tonsillen und Hautwunden, später als interne Positivkontrolle ortsständige Zellen der körpereigenen Abwehr für VCAM-1 und Endothelien für P-Selektin. Für VEGF Ab-3=JH121 (Dianova) waren es Tumorzellen im Hämangiosarkom und für PDGFR, alpha Ab-1 (Dianova) Ovarialkarzinome.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Farbreaktion wurden Negativkontrollen mit dem Ausschluss des Primärantikörpers bei sonst identischer Färbeprozedur durchgeführt. Außerdem dienten als interne Negativkontrollen Endothelien für P-Selektin und ortsständige Zellen der körpereigenen Abwehr für VCAM-1.

2.2 METHODEN

Im Folgenden sind die Färbeverfahren der Schnitte für licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen beschrieben [4, 7, 12, 77, 82]. Die individuelle Vorgehensweise bei den verschiedenen Antikörpern erfolgte gemäß Empfehlung der Herstellerfirmen.

2.2.1 Färbung der Schnitte für lichtmikroskopische Untersuchungen

Vorbehandlung zur Entparaffinierung der Schnitte:

1. 15 Minuten in Xylol
2. 15 Minuten in Aceton
3. 15 Minuten in einem Aceton/Puffer–Gemisch im Verhältnis 1:1
4. Spülung in Puffer (Tris-Puffer bei P-Selektin und VCAM-1/PBS-Puffer bei VEGF und PDGFR)

Demaskierung:

a. **VCAM-1 (CD106)** = 3×5 Minuten in der Mikrowelle, 100-300 Watt, Target Retrieval Solution, pH=9.0 (DAKO, S2368) leicht kochend; Abkühlung: 20 Minuten

b. **VEGF** = 3×5 Minuten in der Mikrowelle, 100-300 Watt, EDTA-Puffer (pH=8.0) leicht kochend; Abkühlung: 20 Minuten

c. **PDGFR** = 3×5 Minuten in der Mikrowelle, 100-300 Watt, Citrat-Puffer (pH=8.0) leicht kochend; Abkühlung: 20 Minuten

d. **P-Selektin (CD62P)** = 15 Minuten mit Proteinase K (DAKO S3020)

Blockierung:

5. Blocker: 10ml H_2O_2 mit 90ml Methanol; 10 Minuten

Färbung zur lichtmikroskopischen Beurteilung:

6. Tris–Puffer (VCAM-1 und P-Selektin) bzw. PBS-Puffer (VEGF und PDGFR)
7. 100µl des mit Antibody-Diluent (DAKO S0809) verdünnten Primär-antikörpers, 30 Minuten
8. Spülung in circa 1000µl Tris-Puffer
9. 100µl biotinylated link; 30 Minuten (LSAB 2-System, AP; DAKO K0676)
10. Spülung in circa 1000µl Tris-Puffer
11. 100µl Streptavidin Alkalische Phosphatase; 30 Minuten (LSAB 2-System, AP; DAKO K0676)
12. Spülung in circa 1000µl Tris-Puffer
13. Tropfen Fuchsin Chromogen + 3 Tropfen Fuchsin Activating Agent aufgefüllt mit Fuchsin Buffered Substrate (LSAB 2-System, AP; DAKO K0676)
14. 2×Spülung in destilliertem Wasser
15. Kernfärbung in Hämalaun; 45 Sekunden
16. 2×Spülung in destilliertem Wasser

Eindeckung:

Die Objektträger wurden um die gefärbten Schnitte herum getrocknet und anschließend mit wässrigem Eindeckmedium (Aquatex/MERCK) und Deckblatt versehen.

2.2.2 Färbung der Schnitte für fluoreszenzmikroskopische Detektionsmethode (CLSM)

Vorbehandlung zur Entparaffinierung der Schnitte:

1) 15 Minuten Entparaffinierung in Xylol
2) 15 Minuten in Aceton
3) 15 Minuten in einem Aceton/Puffer–Gemisch im Verhältnis 1:1
4) Spülung in Tris-Puffer

Demaskierung:

a) **P-Selektin (CD62P)** = 15 Minuten mit Proteinase K

b) **CD 31** = 3×5 Minuten in der Mikrowelle mit Citrat-Puffer

Blockierung:

5) Blockierung mit 100µl 5 %iger BSA; 20 Minuten
6) circa 1000µl Tris-Puffer

Färbung zur CLSM-Beurteilung:

7) 100µl des mit 1 %ger BSA-Lösung verdünnten Primärantikörpers: P-Selektin=CD62P (DAKO) bzw. CD31 (DAKO); 30 Minuten
8) circa 1000µl Tris –Puffer
9) 100µl des mit 1 %ger BSA-Lösung verdünnten Sekundärantikörpers =FITC (DAKO); 30 Minuten

10) 2×Spülung in destilliertem Wasser

Eindeckung:

Die Objektträger wurden um die gefärbten Schnitte herum getrocknet und anschließend mit wässrigem Eindeckmedium (=Vectashield mounting medium for immunfluorenscence) und Deckblatt eingedeckt.

2.2.3 Auswertung und Dokumentation

Die Auswertungen der immunhistochemischen Reaktionen erfolgten am Lichtmikroskop (P-Selektin/CD62P–**70** Fälle, VCAM-1/CD106–**72** Fälle, VEGF Ab-3/JH121–**7** Fälle und PDGFR, alpha Ab-1–**6** Fälle) und am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP: P-Selektin/FITC-**96** Fälle sowie CD31/FITC–**96** Fälle). Hierbei wurde die Lichtmikroskopie als vororientierende Maßnahme gewählt, bei der lediglich eine Teilmenge der zu untersuchenden Konjunktiven verwandt wurde. Für die Untersuchungen mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden zwei Einzelfärbungen mit P-Selektin/FITC und CD31/FITC vorgenommen. Die erworbenen Daten wurden mit dem zugehörigen Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet. Aufgrund der lichtoptischen Ergebnisse in der vororientierenden Untersuchung wurde die Expression von P-Selektin am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) geprüft.

Bei dem verwendeten Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP) wurden zwei Kanäle benutzt, so dass zwei Fluoreszenzsignale (Doppelmarkierungen) im identischen Präparat simultan oder sequentiell gescannt und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden konnten. Der Sekundärantikörper FITC markierte die Endothelien grün (ex/em: 488nm/500-550nm), während die Eigenfluoreszenz die Erythrozyten rot erscheinen ließ (ex/em: 568nm/580-630nm).

2.2.4 Analyse der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung im Hinblick auf die P-Selektin–Expression erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung von Intensität und Vorkommen positiv reagierender Endothelzellen. Erst oberhalb eines Schwellenwertes von 15

Prozent P-Selektin-positiver Gefäßquerschnitte wurde das Ergebnis auch als positiv gewertet, das heißt eine erhöhte P-Selektin-Expression angenommen [18, 19, 20]. Da Rhexisblutungen in der Konjunktiva aufgrund des geringen äußeren Widerstandes bevorzugt im lockeren Bindegewebe zu finden sind, galt diesem Bereich das größte Interesse. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich infolgedessen ausschließlich auf Rupturstellen mit Blutungen und ihrer Umgebung.

Eine Einteilung in Intensität der Färbung erfolgte in:

[Ø] = keine Färbung

[+] = schwache Färbung

[++] = moderate Färbung

[+++] = starke Färbung

Die Auszählung der Gefäße erfolgte im Umfang von 15 Gesichtsfeldern (40er Objektiv). Die durchschnittlich gefärbten Gefäßendothelien wurden ins Verhältnis zu den insgesamt vorhandenen intakten und geschädigten Gefäßen gesetzt (immunhistochemisch nachgewiesene Gefäßendothelien mit Anti-CD31), wobei ein Schwellenwert von 15 Prozent berücksichtigt wurde:

≤ 15 % der Gefäße	= negativer Befund
	noch physiologisch normale Konjunktiva
> 15 % der Gefäße	= positive Endothelantwort
	erhöhte P-Selektin-Expression

2.2.5 Statistische Methoden

Die Datenerfassung erfolgte mit Microsoft Excel 2002. Die statistische Ausarbeitung der Daten wurde mithilfe der Software SPSS für Windows Version 12,0 von Wolfgang Pabst vom Institut für Medizinische Informatik, Arbeitsgruppe Medizinische Statistik der Universität Giessen durchgeführt. Die Darstellung der qualitativen Merkmale erfolgte gemäß den drei untersuchten

Gruppen mithilfe von Kreuztabellen mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. der Errechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit.

3 ERGEBNISSE

3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG MIT VCAM-1

Beim Überblick über das Gesamtmaterial bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der konjunktivalen Endothelien mit Anti-CD106=Anti-VCAM-1 zeigte sich eine überwiegend schwache Gefäßantwort (siehe Tabelle 5). Moderate oder starke endotheliale Färbungen ließen sich nur vereinzelt eruieren. Signifikante Unterschiede im Allgemeinen zwischen den einzelnen Gruppen und im Besonderen zwischen den unterschiedlich langen Überlebenszeiten nach vital entstandener Gefäßläsion zeigten sich nicht.

TABELLE 5 ENDOTHELIALE GEFÄßREAKTIONEN BEI VCAM-1 (LICHTMIKROSKOPIE)

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Intensität der Nachweisbarkeit der endothelialen Gefäßreaktionen in den einzelnen Gruppen.

Gruppen	Fall-zahl	keine Färbung	schwache Färbung	moderate Färbung	starke Färbung
I. Kontrollgruppe	15	7	8	-	-
II. Artefakte	5	1	4	-	-
III. Petechien positiv					
Sekunden	15	5	6	2	2
Minuten	33	10	18	2	3
Stunden	3	1	-	1	1
Tage	1	1	-	-	-
Gesamt	72	25	36	5	6

Wie Tabelle 5 dargestellt, zeigten sich in der Kontrollgruppe mit mechanisch unverletzten Gefäßendothelien (**n=15**) keine bis schwache Anfärbungen.

Die Gefäße der *artefiziell* entstandenen Rupturen (**n=5**) äußerten sich nahezu ausnahmslos mit einer schwachen Anfärbung, nur in einem Fall wurde keine Reaktion beobachtet.

Bei einer Überlebensdauer im Minutenbereich (**n=33**) fiel eine überwiegend schwache Färbung an den Endothelzellen auf. An 18 der insgesamt 33 untersuchten Bindehäute konnte diese beobachtet werden, im Vergleich zu zehn Fällen ohne endotheliale Reaktion. Moderate oder gar starke Färbungen zeigten sich hier nur in Einzelfällen. An den konjunktivalen Endothelzellen mit sekundenlanger Überlebensdauer (**n=15**) zeigte sich meist keine oder nur eine schwache Endothelantwort. Auch hier stellten moderate und starke Reaktionen die Ausnahme dar. Die Fälle mit einer Überlebenszeit von Stunden (**n=3**) zeigten keine bis eine starke Reaktion. Ein Fall mit einer Überlebenszeit von Tagen wies einen negativen Befund auf.

Bei den orientierenden Untersuchungen von VEGF und PDGFR mittels Lichtmikroskopie ergaben sich folgende Resultate.

3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung mit VEGF und PDGFR

Die beiden konjunktivalen Gewebeproben aus der Kontrollgruppe (**n=2**) wiesen bei der Untersuchung mit VEGF keine endothelialen Reaktionen auf, während die Ausprägung der Färbung hinsichtlich PDGFR mit schwacher bis moderater Intensität ausgemacht werden konnte.

Die Augenbindehaut mit den *artefiziell* entstandenen Petechien (**n=1**) zeigte bei VEGF keine Gefäßreaktion, bei den Untersuchungen mit PDGFR reagierten die Endothelien mit moderater Färbeintensität.

An den Gefäßen mit einer Überlebenszeit im Minutenbereich (VEGF: **n=4**/PDGFR: **n=3**) konnten bei VEGF mit Ausnahme eines Falles mit schwacher endothelialer Reaktion ausschließlich negative Befunde festgestellt werden. Hier war es zu einem Schädelhirntrauma mit gleichzeitiger Strangulation gekommen. Mittlere oder starke Gefäßreaktionen traten in keinem

der Fälle auf. Bei der Untersuchung mit PDGFR ergab sich neben zwei negativen Befunden auch eine moderate Reaktion. Hier war es zu einem Grand Mal gekommen.

Konjunktivale Gefäßendothelien mit einer Überlebenszeit von Sekunden wurden nicht mit in die orientierende Untersuchung einbezogen, da die Expression von VEGF bekanntermaßen vor allem in der späten Wundheilungsphase nachgewiesen werden konnte [38]. Überlebenszeiten von Stunden und Tagen wurden aufgrund der prospektiv zu erwartenden geringen Fallzahl nicht untersucht. Weiterführende Untersuchungen kommen insbesondere in dieser späten Phase der Wundheilung in Betracht und bieten Rückhalte für eventuell folgende Arbeiten.

3.3 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG MIT P-SELEKTIN

TABELLE 6 ENDOTHELIALE GEFÄßREAKTIONEN BEI P-SELEKTIN (LICHTMIKROSKOPIE)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Intensität der Nachweisbarkeit der endothelialen Gefäßreaktionen in den einzelnen Gruppen.

Gruppen	Fall-zahl	keine Färbung	schwache Färbung	moderate Färbung	starke Färbung
I. Kontrollgruppe	14	1	2	5	6
II. Artefakte	5	-	5	-	-
III. Petechien positiv					
Sekunden	15	4	6	3	2
Minuten	33	4	14	3	12
Stunden	3	-	1	1	1
Gesamt	70	9	28	12	21

In der Kontrollgruppe der lichtmikroskopischen Untersuchungen mit P-Selektin waren in der Regel an den mechanisch unbeschädigten Endothelien (n=14) überwiegend Färbungen von moderater bis starker Intensität, in zwei Fällen eine

schwache Gefäßreaktion zu verzeichnen (siehe Tabelle 6). Hier war es in beiden Fällen zu einem Myokardinfarkt (Autolyse [+]) gekommen. An einer durch Hitze geschädigten Konjunktiva war keine endotheliale Reaktion nachweisbar.

Bei den *artefiziell* entstandenen Blutungen (n=5) zeigte sich, wie in Tabelle 6 zu sehen ist, eine schwache Anfärbung der Endothelien.

Die minutenlang überlebten Gefäßschäden der Gruppe Petechien positiv (n=33) äußerten sich in 14 Fällen (42,4 %) mit einer schwachen Antwort der Endothelzellen. Moderate und starke Reaktionen fielen in 15 (45,5 %) der insgesamt 33 untersuchten Fälle auf (siehe Tabelle 6). An den Endothelzellen von vier Konjunktiven konnte in dieser Gruppe keine Reaktion beobachtet werden. drei davon zeigten eine hochgradige Gefäßstauung. An den Gefäßendothelzellen der Konjunktiven mit einer Überlebenszeit von Sekunden (n=15) ließen sich keine, schwache, aber auch moderate und starke positive Endothelreaktionen feststellen. Die Konjunktiven mit einer Überlebenszeit im Stundenbereich (n=3) zeigten je eine schwache, eine moderate und eine starke Färbung (siehe Tabelle 6). Es wurden lichtoptisch keine Gewebeproben mit einer tagelangen Überlebenszeit untersucht.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von konjunktivalem Gewebe mit Anti-CD62P=Anti–P-Selektin konnten im Hinblick auf die Färbeintensitäten zwischen den einzelnen Gruppen zwar keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es waren aber bei den vital entstandenen Endothelverletzungen oftmals starke Intensitäten vorhanden (siehe Tabelle 6). In der Gruppe der minutenlang überlebten Gefäßläsionen wurden in 45,5 % der Fälle moderate (++) und starke (+++) Färbungen ermittelt. Artefakte wiesen dagegen lediglich schwache Intensitäten auf, während andererseits bei vital entstandenen Gefäßläsionen und maximaler Stauung ebenfalls schwache Befunde vorlagen. Um weitere Aufklärung zu leisten, wurden die Konjunktiven mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) genauer untersucht, wobei hier zusätzlich zur Intensität der Färbung auch die Anteile der Gefäße mit P-Selektin-positiver Reaktion unter Berücksichtigung eines Schwellenwertes von 15 Prozent erfasst wurden.

3.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit P-Selektin

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Konjunktiven erwies sich Anti-P-Selektin, wie von den lichtmikroskopischen Voruntersuchungen zu vermuten stand, als stabil und technisch gut anzuwenden. Im Hinblick auf die praktische Anwendung in forensischen Histologie-Laboren stellt es somit eine gute Möglichkeit für Routineuntersuchungen dar.

Waren Petechien an den Konjunktiven nachweisbar, so fanden sich Gefäßreaktionen an benachbarten Endothelzellen im Bereich des lockeren Bindegewebes und überwiegend positive Reaktionen im Bereich der Rupturstellen (siehe Abbildung 4). Unter Berücksichtigung einer 15-prozentigen Schwelle positiver Gefäße konnten folgende Untersuchungsergebnisse ermittelt werden (siehe Tabelle 7 vgl. Negativkontrolle in Abbildung 10):

TABELLE 7 ENDOTHELIALE GEFÄßREAKTIONEN BEI P-SELEKTIN (FLUORESZENZMIKROSKOPIE)

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Intensität der Nachweisbarkeit der endothelialen Gefäßreaktionen in den einzelnen Gruppen, unter Berücksichtigung einer Schwelle 15 Prozent positiver Gefäße. Sie zeigt Unterschiede in der P-Selektin-Expression in den drei untersuchten Gruppen (p = 0,005).

Gruppen	Fall-zahl	≤15% der Gefäße	schwache Färbung	moderate Färbung	starke Färbung
I. Kontrollgruppe	19	17	-	2	-
II. Artefakte	12	12	-	-	-
III. Petechien positiv					
Sekunden	15	14	1	-	-
Minuten	34	7	-	6	21
→ bei Ersticken/ Strangulation	10	8	-	-	2
Stunden	5	4	-	-	1
Tage	1	1	-	-	-
Gesamt	96	63	1	8	24

Die in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse zeigen Unterschiede in der P-Selektin-Expression in den drei untersuchten Gruppen. In der Gruppe der vital entstandenen Petechien mit minutenlanger Überlebenszeit war eine erhöhte Expression von P-Selektin festzustellen. Die statistisch berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit p kann hierfür mit 0,005 angegeben werden. Beim statistischen Vergleich von Artefakten mit intravital entstandenen Gefäßläsionen hinsichtlich der endothelialen Expression von P-Selektin ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,022.

Bei der Kontrollgruppe war in der Regel, in 17 von 19 Fällen, eine schwache bis moderate P-Selektin-Reaktion in 1,8-15 % (durchschnittlich 7,6 %) der Gefäßquerschnitte zu verzeichnen (siehe Tabelle 7 und Abbildung 5). In zwei Fällen, einmal mit einer lokalen Infektion, einmal bei Tumortherapie mit Gabe von Metamizol, trat eine moderate Reaktion in 21,3–25,3 % der Gefäßanschnitte auf (siehe Tabelle 7 und Abbildung 9). Da Anti-P-Selektin bei

noch in Granula gespeichertem P-Selektin keine detektierbare Reaktion in der Immunfärbung induziert, muss es sich hierbei um bereits an der Zelloberfläche exprimiertes P-Selektin handeln. Hier waren auch intravasale P-Selektin-positive Thrombozytenaggregate fassbar (siehe Abbildung 3 und Abbildung 9).

Bei den postmortal produzierten Petechien (n=12) inklusive dem Fall, bei dem lediglich fünf Stunden zwischen Tod und Produktion des Artefakts lagen, konnten zwischen 1,2 % und 11,8 % positive (durchschnittlich 6,4 %) Gefäßquerschnitte angetroffen werden, wobei hier eine schwache bis moderate Endothelreaktion gegeben war (siehe Tabelle 7). Hierbei betraf die schwache Reaktion die Anfärbung von einzelnen Zellen im Gefäßquerschnitt. Lokal, also an den Rupturstellen der Gefäße, konnte keine P-Selektin-positive Gefäßwandreaktion oder die Bildung entsprechend reagierender Thrombozytenaggregate festgestellt werden (siehe Abbildung 2, Abbildung 3 und Abbildung 8). Das seltene Auftreten von Artefakten in der rechtsmedizinischen Praxis (zwölf Fälle in sechs Jahren) führt zur geringen Fallzahl in dieser Gruppe.

Petechien bei Todesfällen mit einer Überlebenszeit von einigen Minuten (n=44) wiesen in 29 Fällen zwischen 15,2 % und 98,5 % positive Gefäßquerschnitte (durchschnittlich 36,7 %) auf (siehe Tabelle 7). Die Reaktionen waren hier mit moderat bis stark anzugeben (siehe Abbildung 2 und 4). Im Bereich der Gefäßwandläsionen war eine endotheliale Reaktion fassbar. Zudem waren intraluminale P-Selektin-positive Thrombozytenaggregate (in 31,8 %) zu verzeichnen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). In 15 Fällen stellte sich keine bzw. eine unterhalb des Schwellenwerts von 15 % gelegene Anfärbung von Gefäßquerschnitten dar (1,2–11,9 %, durchschnittlich 5,8 %). Hier bestand jeweils eine maximale Stauung, wobei die Gefäßwände mitunter ausgedünnt und von Erythrozyten überstrahlt erschienen (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). In zwei Fällen stellten sich auch hier intraluminale Thrombozytenaggregate dar. Die Blutungen waren in diesen Fällen ebenfalls stark ausgeprägt. Gerade hierunter waren auch insbesondere die Fälle mit einem massiven Angriff gegen den Hals zu verzeichnen. Ihnen kommt somit eine gesonderte Bedeutung zu.

An Gefäßläsionen bei Fällen, bei denen die Überlebenszeit im Sekundenbereich einzuordnen war (n=15), traten teils schwache, aber sonst

überwiegend starke positive endotheliale Reaktionen bei 1,0-11,8 % (durchschnittlich 4,3 %) der Gefäßquerschnitte auf (siehe Tabelle 7). Intraluminale Thrombozytenaggregate stellten sich in drei Fällen dar. Lediglich in einem Fall wurde die Schwelle von 15 % überschritten (schwache Reaktion bei 18 % reagierender Gefäße). Hier war es zu einem kombinierten Schädelhirn- und Thoraxtrauma gekommen.

Bei den fünf Fällen mit einer stundenlangen Überlebenszeit wurden in vier Fällen 3-10 % meist stark positiv gefärbte Gefäßanschnitte angetroffen (siehe Tabelle 7). In einem Fall waren 42,6 % der Gefäßanschnitte stark angefärbt (siehe Tabelle 7 und Abbildung 2). Hier war es zu einem kardiogenen Schock nach Behandlungsfehler gekommen. Intraluminale Blutgerinnsel stellten sich in einem Fall dar. Ein Fall mit einer Überlebenszeit von zehn Tagen zeigte eine moderate Färbung bei 7,1 % der Gefäßquerschnitte.

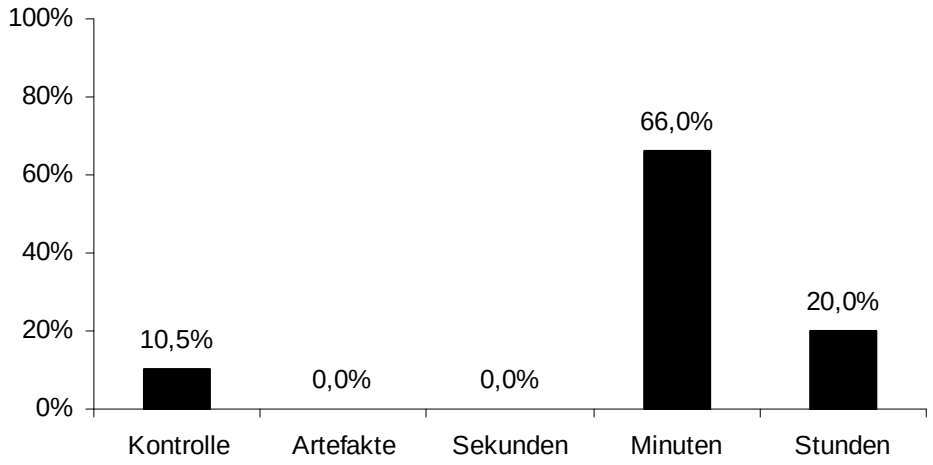

ABBILDUNG 2 FÄLLE MIT MODERATER BIS STARKER ENDOTHELREAKTION (IN %)

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Fälle mit moderater bis starker Endothelreaktionen in Bezug auf die Gesamtzahl der Fälle pro Gruppe unter Berücksichtigung einer Schwelle 15 Prozent positiver Gefäßquerschnitte.

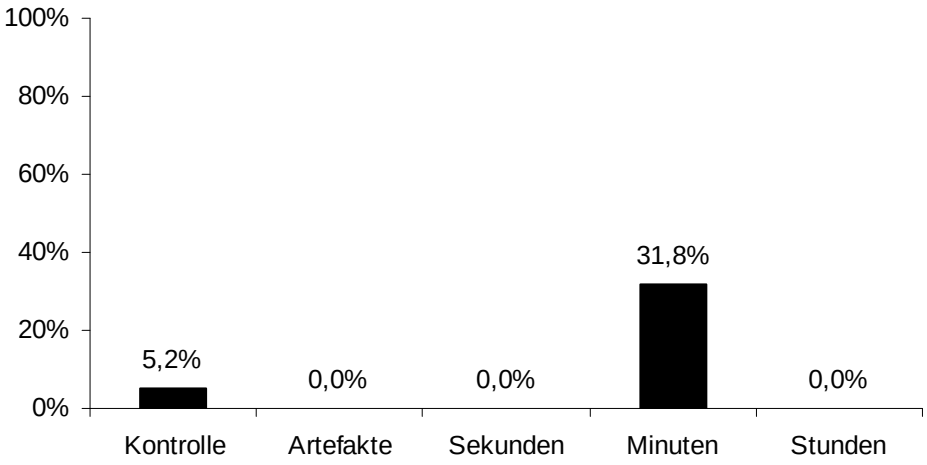

ABBILDUNG 3 PROZENTUALE VERTEILUNG INTRALUMINALER GERINNSEL

Die Graphik zeigt, in wie vielen Fällen bezogen auf die Gesamtzahl pro Gruppe intraluminale Gerinnsel (in %) nachzuweisen waren, unter Berücksichtigung einer Schwelle 15 Prozent positiver Gefäßquerschnitte.

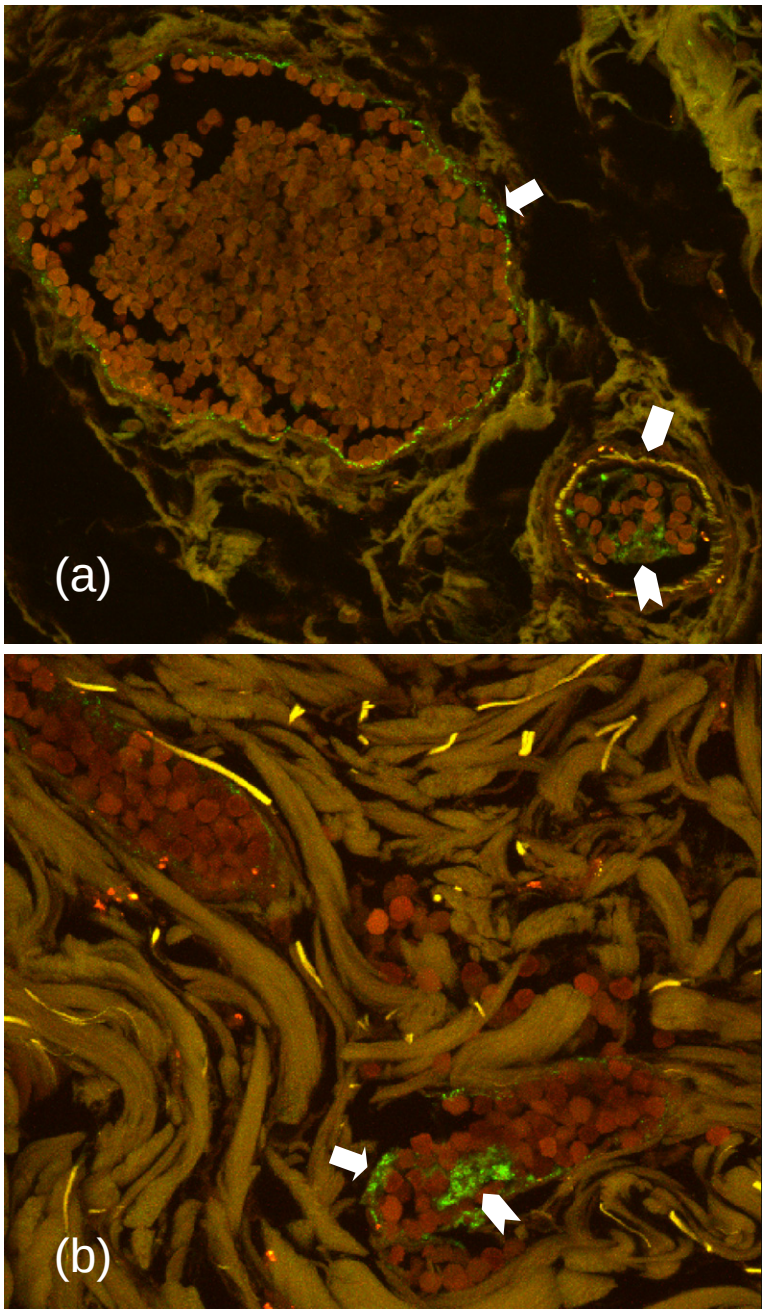

ABBILDUNG 4 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG (CLSM) VON P-SELEKTIN AN VITAL ENTSTANDENEN KONJUNKTIVALEN PETECHIEN

65 Jahre, männlich, Ertrinken, Überlebenszeit Minuten, starke Färbung, 34 % der Gefäßanschnitte

(a) Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL (249µm)^2 x 6µm, P-Selektin-positive Gefäßwände (➡) und in der Nähe eine Thrombozytenaggregation (➡), hier mit P-Selektin-negativem Endothel (➡)

(b) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL (158µm)^2 x 8µm, Rupturstelle mit endothelialer P-Selektin-Expression (➡) und P-Selektin-positivem Thrombozytenaggregat (➡)

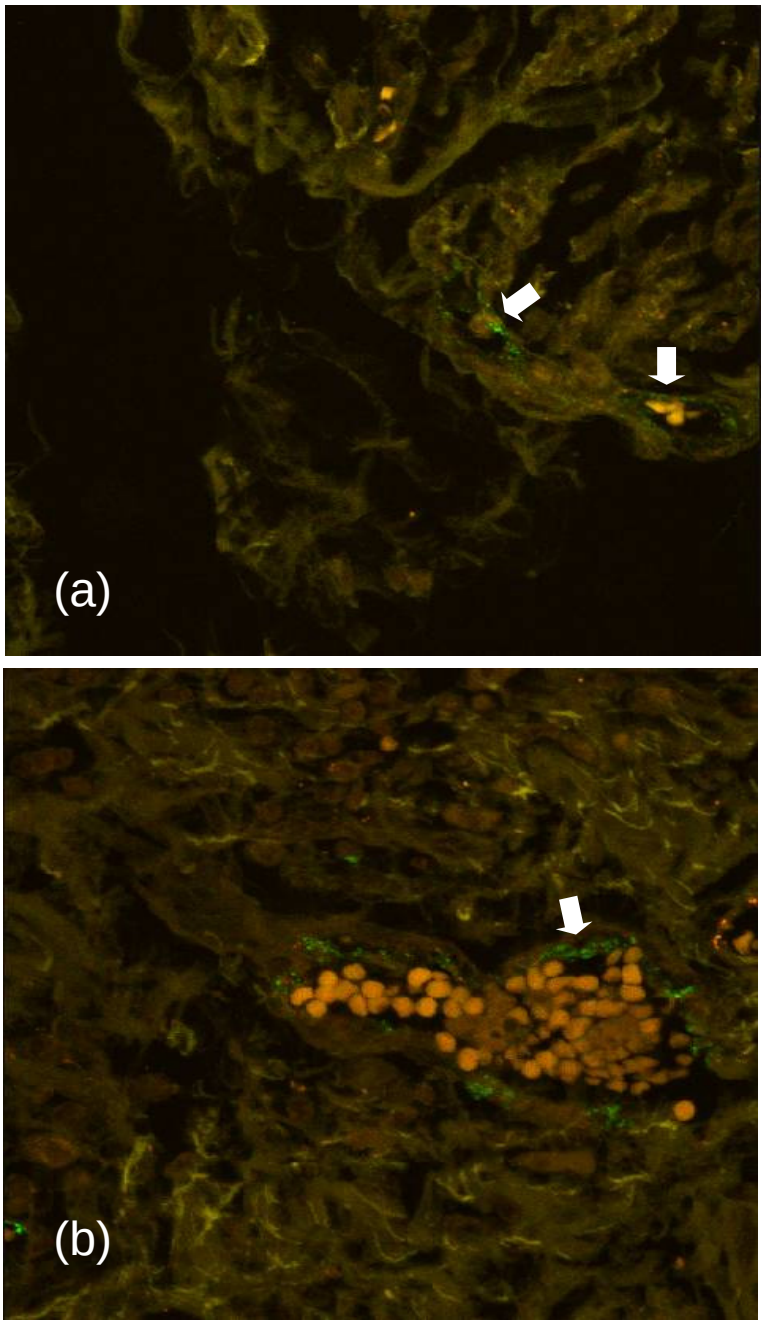

ABBILDUNG 5 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG (CLSM) VON P-SELEKTIN AN UNVERLETZTEN KONJUNKTIVEN

(a) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL (158µm)^2 x 3µm, 84 Jahre, männlich, zentrale Dysregulation, unverletzte Konjunkvtiva, schwache Färbung, 11 % der Gefäßanschnitte; schwach P-Selektin-positive Gefäßwand (➡)

(b) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL, (158µm)^2 x 3µm, 45 Jahre, männlich, Ertrinken, unverletzte Konjunktiva, schwache bis moderate Färbung, 1,8 % der Gefäßanschnitte, moderat P-Selektin-positive Gefäßwand (➡)

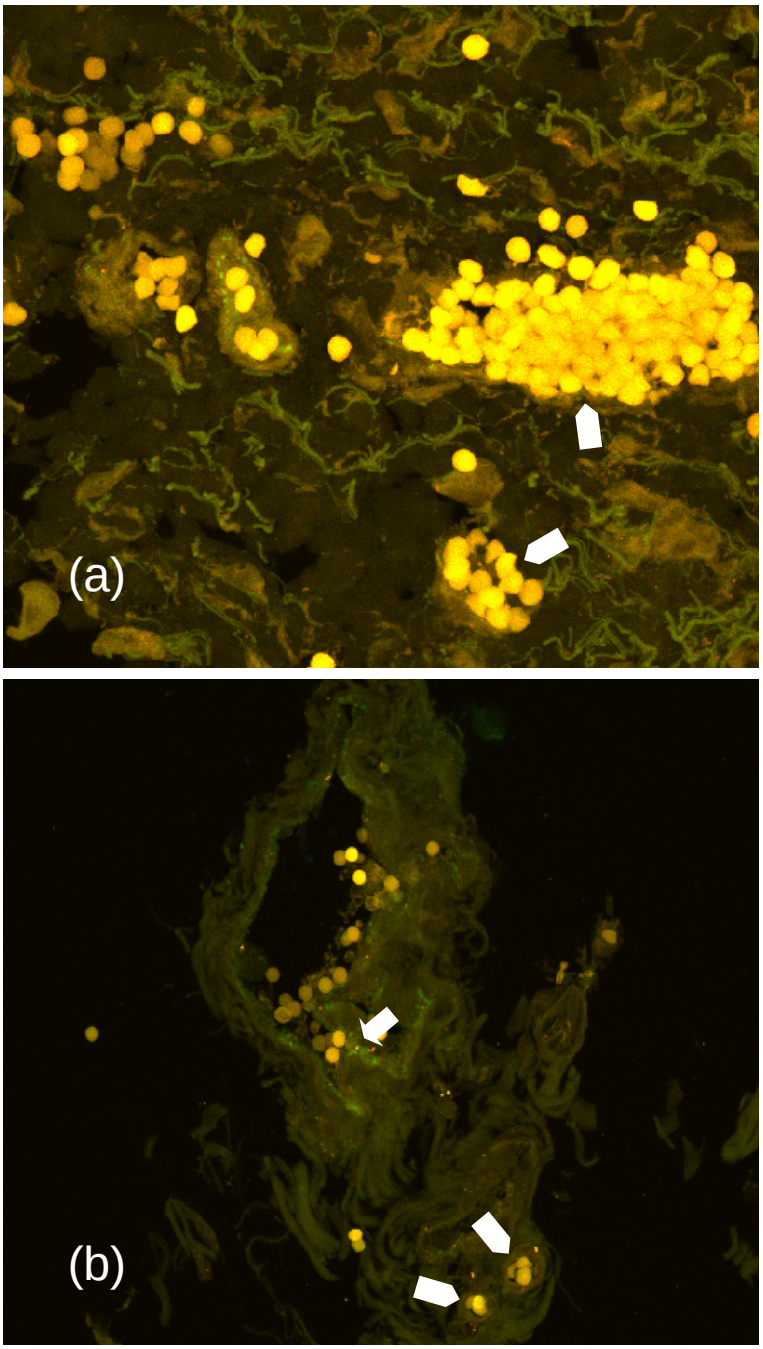

ABBILDUNG 6 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLLUNG (CLSM) VON P-SELEKTIN AN VITAL ENTSTANDENEN KONJUNKTIVALEN PETECHIEN, STARK GESTAUTE GEFÄßE

78 Jahre, weiblich, Halskompression, Überleben Minuten; schwache Färbung, 1,8 % der Gefäß anschnitte

(a) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL (158µm)^2 x 11µm, maximale Stauung, P-Selektin-negativ (➡)

(b) Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL (249µm)^2 x 6µm, Gefäßendothelien ebenfalls P-Selektin negativ (➡), benachbarte Endothelzellen vereinzelt mit positiver Reaktion (➡)

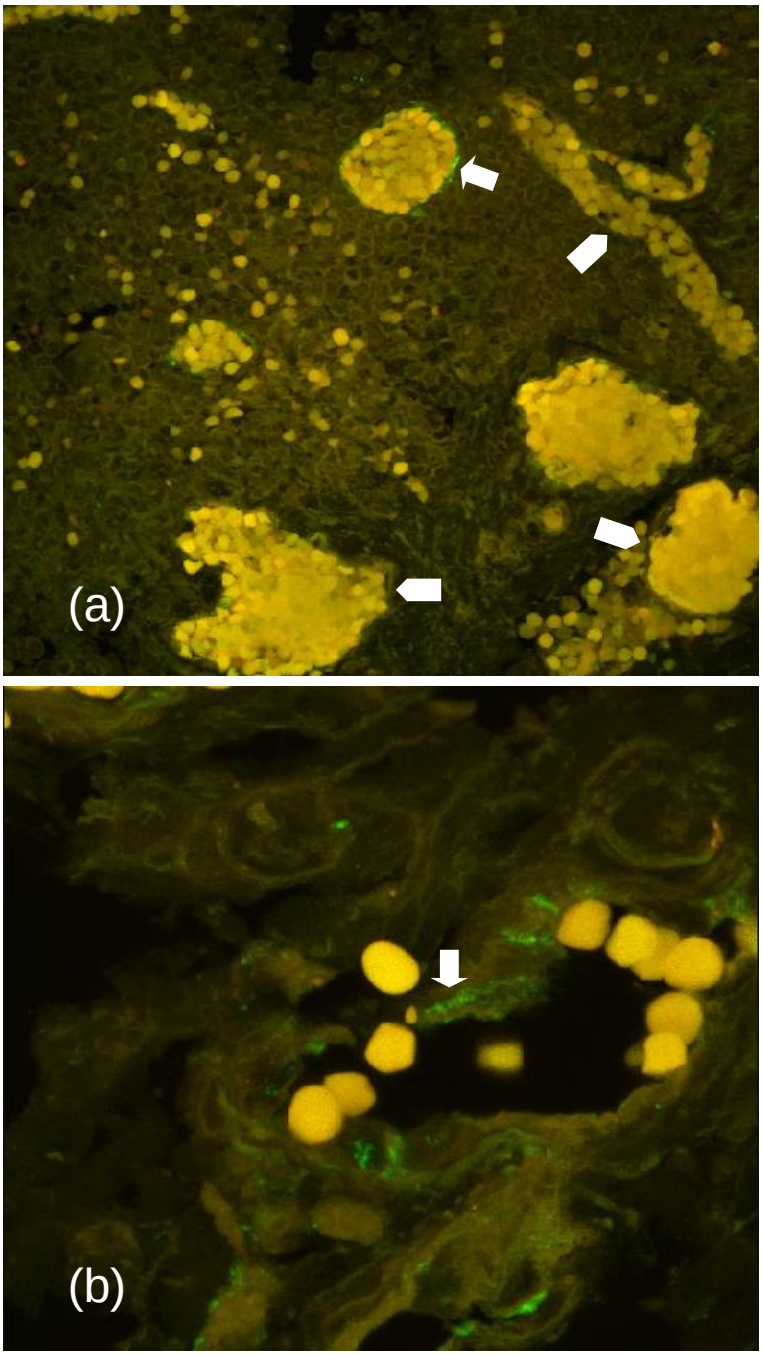

ABBILDUNG 7 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLING (CLSM) VON P-SELEKTIN AN VITAL ENTSTANDENEN PETECHIEN, MASSIVE CONGESTION DER GEFÄßE UND RUPTURSTELLE

53 Jahre, männlich, Atypisches Erhängen, Überleben Minuten, schwache Färbung, 2,7 % der Gefäß anschnitte

(a) Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL (249µm)^2 x 6µm, stark gestautes Gefäß mit positiver Endothelreaktion (➡), Gefäße in der Nachbarschaft mit P-Selektin-negativen Endothelien (➡)

(b) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL (84µm)^2 x 9µm, P-Selektin-positive Rupturstelle (➡)

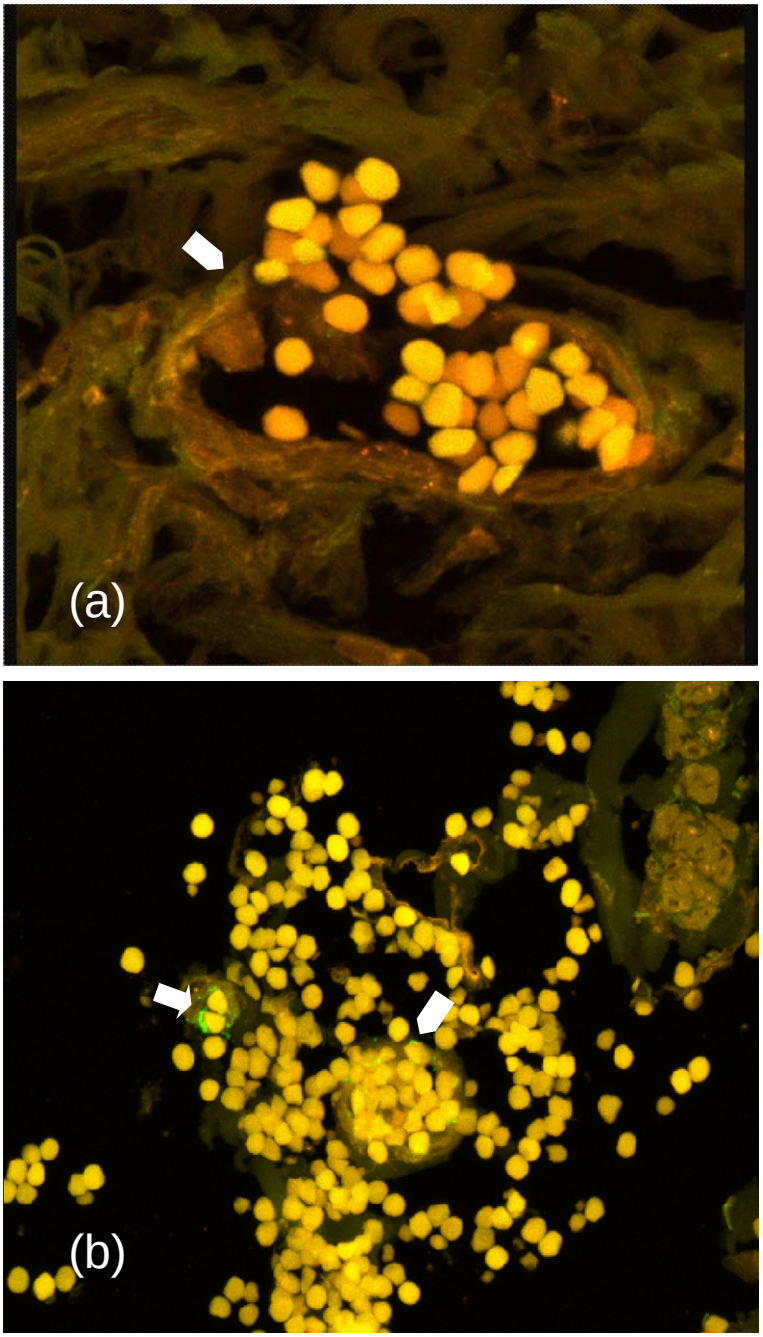

ABBILDUNG 8 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON P-SELEKTIN AN POSTMORTAL ENTSTANDENEN GEFÄßLÄSIONEN

28 Jahre, männlich, Intoxikation; postmortale Liegezeit: 1 Tag; schwache Färbung, 1,4 % der Gefäß anschnitte

(a) Leica TCS SP, HCX PL APO 63,0 x 1,32 OIL (79µm)^2 x 9µm, Rupturstelle ohne P-Selektin-Expression (➡)

(b) Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL, Zoom 1,5, (166µm)^2 x 8µm, einzelne Zellen im Gefäßanschnitt positiv (➡)

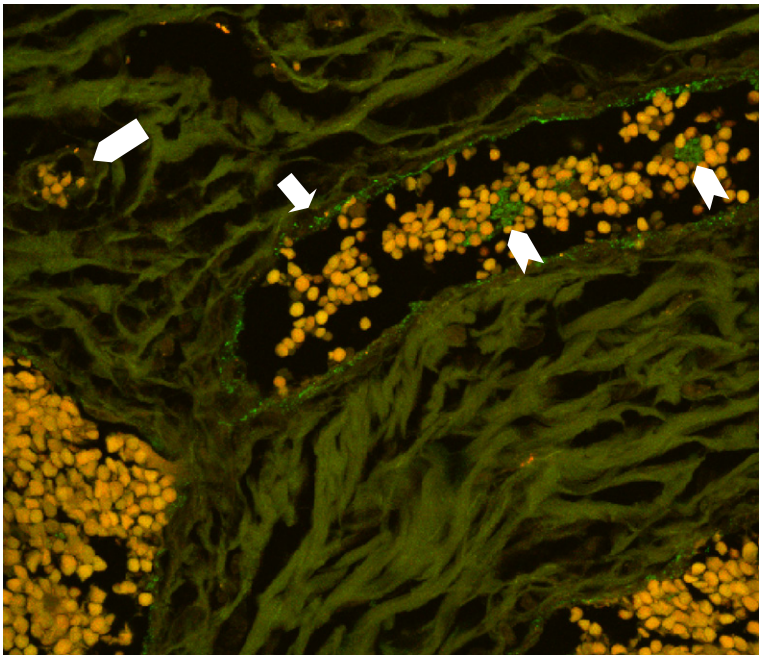

ABBILDUNG 9 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG (CLSM) VON P-SELEKTIN AN EINER UNVERLETZTEN KONJUNKTIVA MIT LOKALER ENTZÜNDUNGSREAKTION

28 Jahre, männlich, Myokarditis, Konjunktivitis bei unverletzter Konjunktiva, moderate Färbung, 21,3 % der Gefäßanschnitte

Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL, $(249\mu m)^2$ x 4µm, lokale Entzündungsreaktion mit P-Selektin-positiven Gefäßwänden (➡) und intraluminalen Thrombozytenaggregaten (➡), benachbartes Gefäß ohne Endothelfärbung (➡)

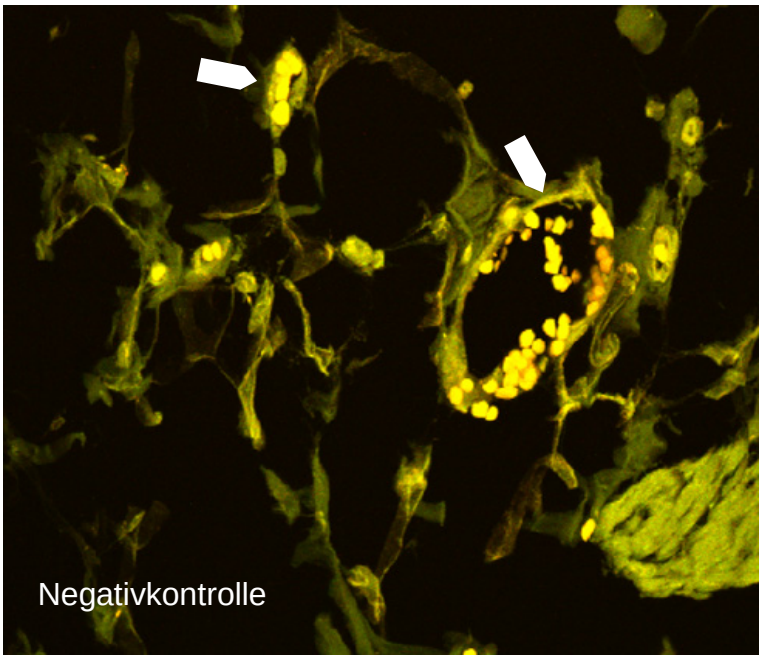

ABBILDUNG 10 NEGATIVKONTROLLE

Leica TCS SP, PL FLUOTAR 40,0 x 1,00 OIL, $(250\mu m)^2$ x 8µm, Endothelien ohne Anfärbung (➡)

4 DISKUSSION

Konjunktivale Petechien sind bereits seit dem 19. Jahrhundert Gegenstand der Diskussion, nehmen sie doch im Hinblick auf die Abgrenzbarkeit von Lagerungsartefakten zu den Folgen intravitaler mechanischer Gewalt gegen den Hals, eine wichtige Rolle in der rechtsmedizinischen Praxis ein. Es konnte, wie bereits lange vermutet, mithilfe des Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops experimentell gesichert werden, dass Rhexisblutungen das patho-morphologische Korrelat zu konjunktivalen Stauungsblutungen darstellen und der Ausgangspunkt somit in der mechanischen Schädigung des Gefäßendothels liegt [48]. Diese Umstände der Gefäßverletzung führen, wenn die Verletzung im Leben gesetzt wurde, zu einer Kaskade von komplexen Wundheilungsvorgängen. Sowohl die an der Schädigung beteiligten als auch die umliegenden Endothelzellen exprimieren vermehrt Interleukine, Selektine und Wachstumsfaktoren, um die Reparatur und somit die Wiederherstellung des Endothels zu unterstützen. Es existieren bereits Untersuchungen über die Nachweisbarkeit verschiedener Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, VCAM-1 und VEGF an menschlichen Hautwunden, aber auch an Konjunktiven wurden Erfahrungen von Seiten der Augenchirurgie gesammelt.

4.1 VCAM-1

Untersuchungen an menschlichen Hautwunden geben die früheste immunhistochemische Nachweisbarkeit von VCAM-1 mit 30 Minuten, die regelmäßige Nachweisbarkeit ab eineinhalb Stunden an [59, 60]. Untersuchungen von Dressler *et al.* wiesen eine stark positive Reaktion von VCAM-1 frühestens drei Stunden und spätestens dreieinhalb Tage nach der Verletzung in menschlichen Hautwunden aus Obduktionsgut und chirurgischem Wundexzisionsmaterial nach [19, 20]. Da das menschliche konjunktivale Gewebe, wie eingangs dargestellt, ein sehr reagibles ist und Wundheilungsvorgänge hier schneller verlaufen als in der menschlichen Haut, war die Möglichkeit zu prüfen,

ob bereits zu früheren Zeitpunkten eine verstärkte Expression von VCAM-1 zu beobachten ist.

Unsere Ergebnisse zeigen jedoch bei Überlebenszeiten bis Stunden nach vital entstandener Verletzung keine verstärkte VCAM–1–Expression. Wie in Tabelle 5 dargestellt, kennzeichnen schwache Endothelreaktionen sowohl die verletzten Endothelien bei Überlebenszeiten im Bereich von Sekunden als auch die im Bereich von Minuten. Artefakte und Kontrollpräparate fielen ebenfalls durch schwache Gefäßantworten auf. Stark positive Gefäßfärbungen waren bei vital entstandenen Endothelläsionen hingegen nur in Einzelfällen zu verzeichnen. Wir konnten das Adhäsionsmolekül in der Konjunktiva mit lichtmikroskopischen Untersuchungen zwar bereits bei Überlebenszeiten von Sekunden und Minuten nach Endothelläsion nachweisen (siehe Tabelle 5). Eine Steigerung seiner Expression, die eine Abgrenzung zu Kontrollen und Artefakten ermöglicht hätte, war jedoch bis auf Ausnahmen nicht festzustellen. Untersuchungen zufolge wurden lösliche VCAM-1–Level zwar auch im Serum Gesunder nachgewiesen, auf eine gezielte Expression an den Endothelzellen der Augenbindehaut bei intakten Gefäßen lässt sich in der Literatur jedoch kein Hinweis finden [29]. Trotzdem ließen sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der *artefiziell* entstandenen Petechien neben negativen Befunden auch schwach positive Reaktionen nachweisen, welche bei intravital verletzten Gefäßendothelien keine verstärkte VCAM-1-Expression erkennen lassen.

Unsere Ergebnisse bestätigend konnte auch bei Untersuchungen zur Inzision menschlicher Konjunktiva unter sterilen Bedingungen unabhängig von der Zeitspanne zwischen Entstehung und Entnahme der Gewebeprobe keine Veränderung der VCAM-1-Expression beobachtet werden [43]. Sterilität ist auch bei der petechialen Rhexisblutung zu vermuten, so dass unter Umständen die gleichen Voraussetzungen gelten. Auch an intravital rupturierten Kapillargefäßen der Augenbindehaut scheint die Produktion von VCAM-1 im Vergleich zu mechanisch unbeschädigten Endothelien und *artefiziell* entstandenen Läsionen keine signifikante Veränderung zu erfahren und somit keinen maßgeblichen Einfluss auf die frühe Wundheilung zu haben. Die lichtmikroskopische Untersuchung von VCAM-1 an Gefäßendothelien von petechialen Bindehautblutungen eignet sich infolgedessen nicht zur

Einschätzung von frühen Wundheilungsvorgängen. Auf weiterführende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde aufgrund der mangelnden Differenzierungsmöglichkeit verzichtet.

4.2 VEGF UND PDGFR

Die Untersuchung der VEGF- und PDGFR-Expression an konjunktivalen Endothelien kann bei der geringen Gesamtmenge nur einen orientierenden Charakter besitzen. An menschlichen Konjunktiven mit vital entstandener Gefäßläsion war der Wachstumsfaktor VEGF nach vital induzierter Endothelverletzung und minutenlanger Überlebenszeit nur in einem Fall immunhistochemisch schwach nachzuweisen. Kontrollpräparate und Konjunktiven mit *artefiziell* entstandenen Blutungen zeigten keine Reaktionen auf Anti-VEGF. Weiterführende licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen könnten möglicherweise die Untersuchungsergebnisse von Hayashi *et al.* bestätigen. Sie konnten VEGF an menschlichen Hautwunden vereinzelt bereits Stunden nach Verletzung, häufiger jedoch mit zunehmendem Wundalter ab vier Tagen und signifikant zwischen dem siebten und vierzehnten Tag nachweisen. Es liegen Ergebnisse vor, dass VEGF bis einschließlich 21. Tag nach Wundentstehung beobachtet werden kann [38].

Gefäßantworten auf Anti-PDGFR geben in den ersten immunhistochemischen Untersuchungen keine Hinweise auf eine verstärkte Expression des Wachstumsfaktors unter initial vital entstandenen Endothelläsionen und minutenlanger Überlebenszeit. Schwache bis moderate Färbungen konnten auch bei *artefiziell* entstandenen Gefäßverletzungen und in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Um genauere Aussagen über die Expression von VEGF und PDGF treffen zu können, sind weiterführende Untersuchungen insbesondere in der späten Phase der Wundheilung (Stunden und Tage) notwendig. Allerdings erschienen diese aufgrund zu erwartender geringer Fallzahlen (fünf Fälle/ein Fall mit Überlebenszeit von Stunden/Tagen innerhalb von sechs Jahren), zurzeit wenig Erfolg versprechend.

4.3 P-SELEKTIN ALS VITALITÄTSPARAMETER

P-Selektin wird bei Endothelschädigung und nach Aktivierung durch Thrombin und Histamin innerhalb von Minuten an der Zelloberfläche präsentiert und führt zur Adhäsion von Leukozyten [37]. Eine zusätzliche Synthese des P-Selektins wird nochmals durch Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder den Tumornekrosefaktor α (TNF-α) innerhalb der ersten zwei Stunden nach Aktivierung erreicht. Es war somit zu erwarten, dass P-Selektin in diesem Zeitraum immunhistochemisch stärker detektierbar ist [65, 66, 67, 68].

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen war bei den vitalen Endothelverletzungen an den Konjunktiven hinsichtlich der unterschiedlich langen Überlebenszeit in den einzelnen Gruppen im Hinblick auf die Intensität keine Differenzierung möglich (siehe Tabelle 6). Zwar wurden bei den minutenlang überlebten Gefäßrupturen auch mittlere und starke Reaktionen ermittelt, diese waren jedoch, insbesondere im Vergleich zu Kontrollgruppe und Artefakten nicht in ausreichender Anzahl vorhanden, um signifikante Unterschiede erkennen zu können. Bei den Artefakten waren lediglich schwache Intensitäten zu vermerken. Andererseits zeigten sich schwache Intensitäten auch bei maximaler Stauung. Von der Untersuchung mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) war bei stabilem und technisch gut anzuwendendem Antikörper (Anti-P-Selektin) weitere Aufklärung zu erwarten.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde gemäß der Annahme, Gefäßrupturen bei konjunktivalen Stauungsblutungen folgen den Gesetzmäßigkeiten der Wundheilung steriler Gefäßverletzungen entsprechend augenchirurgischen Erfahrungen, bei minutenlanger Überlebenszeit eine erhöhte Expression von P-Selektin an den Gefäßen der Augenbindehäute und besonders der Rupturstellen festgestellt (siehe Tabelle 7, Abbildung 2 und Abbildung 4). Hier waren eine moderate bis starke Farbausprägung, häufig in Kombination mit intensiv reagierenden intraluminalen Thrombozytenaggregaten zu erkennen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4), wobei die starke Intensität intraluminaler Aggregate vermutlich in der deutlich höheren Konzentration von P-Selektin innerhalb der Thrombozyten im Vergleich zum Endothel begründet

liegt [65, 66, 67, 68]. Wie auch Untersuchungen an Hautwunden zeigen, richtet sich die Expression von P-Selektin nach den zeitlichen Vorgängen der Wundheilung. Nach rascher Expression, Minuten (circa drei) nach Endothelschädigung und einem Anstieg von P-Selektin, folgen nach Stunden (circa zwölf) wieder der Abfall und eine verminderte Nachweisbarkeit [18, 19, 20]. Nach diesen Voruntersuchungen an der Haut nicht anders zu erwarten, war an unserem Kollektiv bei einer Überlebenszeit von Stunden/Tagen keine verstärkten P-Selektin-Expression im Bereich der Rupturstelle mehr nachzuweisen (siehe Tabelle 7). Die Ergebnisse der tagelang überlebten Gefäßläsionen lassen aber aufgrund der geringen Anzahl keine genaue Aussage zu.

Es stellt sich hier nun die Frage, warum gerade bei Erstickungstodesfällen/Fällen mit mechanischer Gewalteinwirkung gegen den Hals und intensivem Stauungssyndrom bei einer Überlebenszeit von Minuten negative Befunde auffallen (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Durch den ansteigenden venösen Druck bei mechanischem Verschluss der Venen bei offenen Arterien und/oder beim Ankämpfen oder Schreien gegen den Widerstand der verschlossenen äußeren Atemwege im Sinne eines Valsalva-Effektes kommt es zu einer massiven Stauung in den Gefäßen. Diese stellen sich mikroskopisch bis zum Bersten gefüllt dar und lassen fluoreszenzmikroskopisch oftmals keine oder aber nur eine strichförmig ausgezogene mitunter in sich unterbrochene hauchdünne Gefäßwand abgrenzen. Hier sind ursächlich mechanisch gedehnte Wände zu vermuten. Der Negativbefund wäre z.B. durch die mechanische Veränderung an der Zellmembran, auf der P-Selektin von Weibel-Palade-bodies eigentlich freigesetzt und präsentiert wird, möglicherweise aber auch durch ein Überlagerungsartefakt durch die Fluoreszenz der Erythrozyten zu erklären [6, 66]. Darüber hinaus ist bei dem erhöhten Blutaufkommen auch an gesteigerte enzymatische Abbau- und Auswaschprozesse zu denken [5, 8, 9].

Lichtmikroskopische Untersuchungen von Ortmann und Brinkmann weisen auf eine Verminderung der P-Selektin–Synthese an Endothelien chronisch entzündeten Lungengewebes hin [74]. Ursächlich diskutiert werden sowohl eine Metabolisation als auch ein verstärkter enzymatischer Abbau des Selektins [5]. Ein physiologischer enzymatischer Abbau für die zellmembranassoziierten

Selektine konnte bereits verifiziert werden [73]. Es steht also zu vermuten, dass unterschiedlich intensiv ausgeprägte Endothelreaktionen unterschiedliche Stadien der Wundheilung widerspiegeln. Befindet sich die Wundheilung in einer fortgeschrittenen Phase, so ist gleichzeitig mit einem vermehrten enzymatischen Abbau des Selektins und einer schwächeren oder gar negativen Reaktion an den Endothelien zu rechnen.

Bei postmortal durch Lagerung entstandenen Petechien und mechanisch unversehrten Gefäßen war unter Ausschluss lokaler Prozesse wie beispielsweise Entzündungen, welche ebenfalls mit erhöhter Expression des Adhäsionsmoleküls einhergehen können (siehe Abbildung 9), keine erhöhte Aktivität nachvollziehbar (siehe Tabelle 7, Abbildung 5 und Abbildung 8). Die postmortal entstandenen Gefäßläsionen zeigten bei unseren Untersuchungen an den Endothelzellen im Bereich der Rupturstelle ausnahmslos keine Reaktionen auf Anti-P-Selektin (siehe Abbildung 8). Eine vermehrte Expression des endothelialen Adhäsionsmoleküls war auch an den übrigen Gefäßen in diesen Fällen nicht nachzuweisen. Insofern erbrachten die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) einen Zusammenhang zwischen vitaler Entstehung konjunktivaler Rhexisblutungen und einer erhöhten endothelialen P-Selektin-Expression mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,022.

Eine Abgrenzung von vital entstandenen zu lagerungsbedingten *artefiziellen* Blutungen ist nach den Untersuchungen nur bei positivem Befund möglich, also bei einer P-Selektin positiven Endothelreaktion an der Rupturstelle, unter Umständen auch mit intraluminalen P-Selektin positiven Thrombozytenaggregaten, und einer P-Selektin-Expression an mehr als 15 Prozent der benachbarten Gefäßquerschnitte. Folglich kann die vermehrte Expression als Differentialkriterium zwischen vital und postmortal entstandenen Läsionen genutzt werden und bietet eine entscheidende Hilfe bei der Bewertung unklarer Halsbefunde in Zusammenhang mit Bauch- und/oder Kopftieflage.

Eine nachweislich erhöhte P-Selektin-Expression (P-Selektin-positive Reaktion an der Rupturstelle, gegebenenfalls mit P-Selektin-positiven intraluminalen Thrombozytenaggregaten und mehr als 15 Prozent P-Selektin-positive

Gefäßanschnitte in der Umgebung) bei konjunktivalen Stauungsblutungen spricht für eine minutenlange Überlebenszeit und ist, auch differentialdiagnostisch bei Bauch- und/oder Kopftieflage, als Vitalparameter anzunehmen.

Einem negativen Befund kommt für sich alleine gesehen eine nur eingeschränkte Aussagekraft zu. Hier sind die übrigen Anknüpfungstatsachen wie beispielsweise die Einnahme von Medikamenten (Heparin, Glukokortikoiden), Konsum von Alkohol und/oder Drogen und/oder Befunde wie autolytische Veränderungen oder massive Stauung der Gefäße mit enzymatischen Abbauprozessen in eine individuelle Fallbewertung mit einzubeziehen [28, 43].

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die CLSM-Befunde mit multiplen Rupturen in der venösen Endstrombahn weisen die konjunktivale Petechie als Rhexisblutung aus, wie schon nach theoretischen Überlegungen und praktischen Erfahrungen in der modernen Rechtsmedizin seit langer Zeit angenommen wird. Hierbei ergaben sich, abgesehen von Krankheitsbildern mit direkten Gefäßwandschäden, keine Unterschiede darin, in welchem Kontext sie entstanden waren, das heißt ob sie im Rahmen eines mechanischen Angriffs gegen den Hals, bei einer anderen nicht natürlichen Todesursache wie z.B. Schädelhirntrauma, bei natürlichen Todesarten, wie z.B. Herzinfarkt oder aber als Lagerungsartefakt beobachtet wurden.

Zur Frage der Vitalität, die sich immer dann ergibt, wenn man z.B. an Bauchlage und/oder Kopftieflage denkt, und auch gegebenenfalls zur Einschätzung des Wundalters, wurde die Anwendbarkeit von endothelialen Adhäsionsmolekülen (**P-Selektin, VCAM-1, VEGF, PDGFR**) anhand eines rechtsmedizinischen Untersuchungskollektivs (P-Selektin: Petechien positiv: **n=65**, Petechien negativ: **n=19**; Artefakte: **n=12**; VCAM-1: Petechien positiv: **n=52**; Petechien negativ: **n=15**; Artefakte: **n=5**; VEGF/PDGFR, orientierend : Petechien positiv: **n= 4/3**, Petechien negativ: **n=2/2**; Artefakte: **n= 1/1**) geprüft.

Bei dem zeitlich engen Fenster (Überlebenszeit: Sekunden bis Minuten) war im Hinblick auf die lichtmikroskopische Untersuchung von VCAM-1, VEGF, PDGFR an dem hier untersuchten Autopsie-Material mit Leichenliegezeiten zwischen circa fünf Stunden und dreizehn Tagen und quasi sterilen Gegebenheiten bei der Verletzung, sozusagen von innen heraus, keine Aussage zu Vitalität und Wundalter zu treffen.

Zusammenfassend ist hinsichtlich der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (CLSM) der Expression von P-Selektin eine positive Reaktion (P-Selektin-positive Endothelreaktion an der Rupturstelle, gegebenenfalls mit P-Selektin-positiven intraluminalen Thrombozytenaggregaten, und mehr als 15 Prozent P-Selektin-positive benachbarte Gefäßanschnitte), auch

differentialdiagnostisch bei Bauch und/oder Kopftieflage, als Vitalitätsparameter anzunehmen und spricht für eine minutenlange Überlebenszeit. Einem negativen Befund kommt nur eingeschränkte Aussagekraft für sich alleine zu. Hier sind die übrigen Anknüpfungstatsachen und Befunde in eine individuelle Fallbewertung einzubeziehen.

6 ABSTRACT

CLSM-results with multiple ruptures in the venous terminal vessels define the conjunctival petechiae as rhexis-hemorrhage, which had been hypothesized for a long time, both on the basis of theoretical considerations and practical experience in forensic medicine. Disregarding disease patterns with direct damage of vessel walls, no differences with respect to context of origin could be found, i.e. whether they were observed in the context of a mechanical attack to the throat, of another non-natural course of death such as craniocerebral injury, of natural courses of death such as cardiac attack, or as an artefact because of the position of the body.

With respect to the question of vitality, which always comes up when one thinks e.g. of prone position and/or low position of head, and possibly also with regards to wound age estimation, the applicability of endothelial adhesion molecules (**P-selectin, VCAM-1, VEGF, PDGFR**) by means of a forensic research collective (P-selectin: petechiae positive: **n=65**, petechiae negative: **n=19**; artefacts: **n=12**; VCAM-1: petechiae positive: **n=52**; petechiae negative: **n=15**; artefacts: **n=5**; VEGF/PDGFR: petechiae positive: **n=4/3**, petechiae negative: **n=2/2**; artefacts: **n=1/1**) was tested.

Due to the narrow time frame (survival time: seconds to minutes), the examination with optical microscope of VCAM-1, VEGF, PDGFR carried out with the autopsy material here used (post-mortem interval of approximately five hours to thirteen days, and quasi-sterile conditions of injury) no statement could be made with regards to vitality and wound age.

In summary, a positive reaction with respect to fluorescence microscopic examination (CLSM) of P-selectin expression (P-selectin-positive endothelial reaction at the place of rupture, possibly with P-selectin-positive intraluminal thrombocyte aggregations, and more than 15 % of P-selectin-positive neighboring blood vessel sections), also differential-diagnostically in case of prone position or when the head is lower than the rest of the body, is to be considered as vitality parameter and indicates a survival time of some minutes.

A negative result seen on its own has only limited significance. Here the other pertaining facts and findings have to be taken into account for an individual assessment of the case.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Altannavch TS, Roubalova K, Kucera P, Andel M (2004): Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiol Res* **53**: 77-82

2. Asako H, Kurose I, Wolf R, DeFrees S, Zheng ZL, Phillips ML, Paulson JC, Granger DN (1994): Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest* **93**: 1508-1515

3. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ (1993): Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* **68**: 122-124

4. Barrett JT (1978): Textbook of immunology: an introduction to immuno-chemistry and immunobiology. *CV Mosby Co*

5. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD (1998): P-selectin and platelet clearance. *Blood* **92**: 4446-4452

6. Bonfanti R, Furie BC, Wagner DD (1989): PADGEM (GMP-140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**: 1109-1112

7. Bourne JA (1997): Handbuch der Immunperoxidase-Färbemethoden. *DAKO Corporation*

8. Brinkmann B, Koops E, Wischhusen F, Kleiber M (1981): Halskompression und arterielle Obstruktion. *Rechtsmed* **81**: 59-73

9. Brinkmann B, Püschel K, Bause HW, Doehn M (1981): Zur Pathophysiologie der Atmung und des Kreislaufs bei Tod durch obstruktive Asphyxie. *Rechtsmed* **87**: 103-116

10. Bschor F (1969): Beurteilung von Stauungsblutungen im Kopfbereich bei Strangulation und anderen Todesursachen. *Beitr Gerichtl Med* **25**: 146-152

11. Buchner E (1872): Entziehung der Luft. In: Buchner E (1872): Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. *Finsterling:* 323-343

12. Bullock GR, Petrusz P (1982): Techniques in immunocytochemistry. *Acad Press*

13. Carlos TM, Harlan JM (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101

14. Claesson-Welsh L, Heldin CH (1989): Platelet-derived growth factor. Three isoforms that bind to two distinct cell surface receptors. *Acta Oncol* **28**: 331-334

15. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D (1990): Vascular permeability factor: a tumor derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity and promotes monocyte migration. *J Exp Med* **172**: 1535-1545

16. Conchello JA, Lichtman JW (2005): Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* **2**: 920-931

17. Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD (2005): Activated platelets induce Weibel-Palade body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* **106***:* 2334-2339

18. Dressler J, Bachmann L, Koch R, Müller E (1999): Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* **112**: 39-44

19. Dressler J, Bachmann L, Strejc P, Koch R, Müller E (2000): Expression of adhesion molecules in skin wounds: diagnostic value in legal medicine. *Forensic Sci Int* **113**: 173-176

20. Dressler J, Strejc P, Klir P, Müller E, Boubelik O, Grossova I (2002): Time-related expression of adhesive proteins and other markers of age of injuries. *Soud Lek* **47**: 38-44

21. Dvorak HF, Detmar F, Claffey KP, Nagy JA, Van de Water L, Senger DR (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **107**: 233-235

22. Ely SF, Hirsch CS (2000): Asphyxial deaths and petechiae: a review. *J Forensic Sci* **45**: 1274-1277

23. Emmert C (1900): Tod durch Erstickung. In: Emmert C (1900): Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. *Thieme*: 200-247

24. Fitzgerald KA, O`Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE (2001): PDGF. In: Fitzgerald KA, O`Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE (2001): The cytokine–Facts Book, *Academic Press*: 426-435

25. Friberg TR, Weinreb RN (1985): Ocular manifestations of gravity inversion. *JAMA* **253**: 1755-1757

26. Furie B (2005): P-selectin and blood coagulation–it`s not only about inflammation any more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 877-878

27. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J (2004): Vascular endothelial growh factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophtalmol Scand* **82**: 557-563

28. Gao Y, Li N, Fei R, Chen Z, Zheng S, Zeng X (2005): P-selectin–mediated acute inflammation can be blocked by chemical modified Heparin, RO-Heparin. *Mol Cells* **19**: 350-355

29. Gearing AJH, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ (1992): Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1: pathological significance. *Ann NY Acad Sci* **667**: 324-331

30. Gearing AJH, Newman W (1993): Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**: 506-512

31. George D (2003): Targeting PDGF receptors in cancer–rationales and proof of concept clinical trials. In: Llombart-Bosch A, Felipo V (2003): New

Trends in Cancer for the 21st Century. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*: 141-151

32. Gerber HP, Mc Murtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**: 30336-30343

33. Grüb M (2004): Anatomie. In: Schlote T, Grüb M, Mielke J, Rohrbach M (2004): Taschenatlas Augenheilkunde. *Thieme*: 2-7

34. Gruschwitz MS, Hornstein OP, Vondendriesch P (1995): Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* **38**: 184-189

35. Haberda A (1898): Über das postmortale Entstehen von Ecchymosen. *Vjschr Gerichtl Med* **15**: 248-260

36. Hansen TK, Fisker S, Dall R, Ledet T, Jorgensen JO, Rasmussen LM (2004): Growth hormone increases vascular cell adhesion molecule 1 expression: in vivo and in vitro evidence. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 909-916

37. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ (1989): Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* **264**: 7768-7771

38. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T (2004): Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. *Int J Legal Med* **118**: 320-325

39. Helintö M, Renkonen R, Tervo T, Vesaluoma M, Saaren-Seppälä H, Haahtela T, Kirveskari J (2004): Direct in vivo monitoring of acute allergic reactions in human conjunctiva. *J Immunol* **172**: 3235-3242

40. Henn RHE, Liebhardt E, Haug W (1973): Serienschnittuntersuchungen an Stauungsblutungen. *Beitr Gerichtl Med* **30**: 146-147

41. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW (1993): P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* **65**: 1560-1569

42. Kanwar S, Bullard DC, Hickey MJ, Smith CW, Beaudet AL, Wolitzky BA, Kubes P (1997): The association between a4-integrin, P-selectin and E-selectin in an allergic model of inflammation. *J Exp Med* **185**: 1077-1087

43. Kirveskari J, Helinto M, Moilanen JA, Paavonen T, Tervo TM, Renkonen R (2002): Hydrocortisone reduced in vivo, inflammation-induced slow rolling of leucocytes and their extravasation into human conjunctiva. *Blood* **100**: 2203-2207

44. Klein LM, Lavker RM, Matis WL, Murphy GF (1989): Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8972-8976

45. Knorr M, Denk PO (2002): Okuläre Wundheilung – zelluläre und molekulare Grundlagen. In: Rohrbach JM, Streuhl KP, Knorr M, Kirchhof B (2002): Ophtalmologische Traumatologie. *Schattauer*: 289-330

46. Kubes P, Kanwar S (1994): Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules: a P-selectin-mediated event. *J Immunol* **152**: 3570-3577

47. Langerak AW, van der Linden-van Beurden CA, Versnel MA (1996): Regulation of differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptor mRNA in normal and malignant human mesothelial cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1305**: 63-70

48. Lasczkowski G, Rißе M, Gamerdinger U, Weiler G (2005): Pathogenesis of conjunctival petechiae. *Forensic Sci Int* **147**: 25-29

49. Lasky LA (1995): Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* **64**: 113-139

50. Leung DY, Pober JS, Cotran RS (1991): Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in elicited late phase allergic reaction. *J Clin Invest* **87**: 1805-1809

51. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Sinnger MS, Lasky LA, Rosen SD (1991): Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* **77**: 2553-2555

52. Lichtman JW, Conchello JA (2005): Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**: 910-919

53. Lin AG, Jazrawi RP, Levy JH, Petroni ML, Douds AC, Maxwell JD, Northfield TC (1995): Soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **22**: 416-422

54. Lippert H (2001): Wachstumsfaktoren und ihre Rolle in der Wundheilung. *Hartmann WundForum* **3**: 16-19

55. Lobb RR, Chi-Rosso G, Leone DR, Rosa MD, Bixler S, Newman BM, Luhowskyj S, Benjamin CD, Dougas IG, Goelz SE (1991): Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial-leucocyte adhesion molecule 1. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1498-1504

56. Lobb RR, Hemler ME (1994): The pathophysiologic role of α4 integrins in vivo. *J Clin Invest* **94**: 1722-1728

57. Lorant DE, Patel KP, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmermann GA (1991): Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* **115**: 223-234

58. Luke JL (1971): Conjunctival petechiae. *N Engl J Med* **284**: 1101

59. Madea B, Grellner W (2002): Vitale Reaktionen-Teil 1. *Rechtsmed* **12:** 378-394

60. Madea B, Grellner W (2003): Vitale Reaktionen-Teil 2. *Rechtsmed* **13**: 32-48

61. Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM (1990): IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* **145**: 2886-2895

62. Maxeiner H (1997): Über Kopfstauung, Petechien und Zyanose beim Tod durch homizidale Halskompression. *Rechtsmed* **7**: 37-44

63. Maxeiner H, Winklhofer A (1999): Petechiale Lidhaut- und Konjunktival-blutungen bei verschiedenen Todesursachen-Häufigkeiten und Einflussfaktoren. *Rechtsmed* **10**: 7-13

64. Maxeiner H, Winklhofer A (1999): Eyelid petechiae and conjunctival hemmorrhage after cardiopulmonary resuscitation. *Arch Kriminol* **204**: 42-51

65. McEver RP, Martin MN (1984): A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* **259**: 9799-9804

66. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF (1989): GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* **84**: 92-99

67. McEver RP (1991): GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium*. J Cell Biochem* **45**: 156-161

68. McEver RP, Moore KL, Cummings RD (1995): Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* **270**: 11025-11028

69. Meller D, Steuhl KP (2002): Traumatologie der Bindehaut. In: Rohrbach JM, Streuhl KP, Knorr M, Kirchhof B (2002): Ophtalmologische Traumatologie. *Schattauer*: 54-59

70. Meng H, Tonnesen MG, Marchese ML, Clark RA, Bahou WF, Gruber BL (1995): Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J Cell Physiol* **165**: 40-53

71. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR (2004): Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* **172**: 4618-4623

72. Mrowka C, Sieberth HG (1995): Detection of circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in Wegener`s granulomatosis, systemic lupus erythematosus and chronic renal failure. *Clin Nephrol* **43**: 288-296

73. Newman W, Beall LD, Carlson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, Gobal TV, Wiener-Kronish J, Matthay MA (1993): Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* **150**: 644- 654

74. Ortmann C, Brinkmann B (1997): The expression of P-selectin in inflammatory and non-inflammatory lung tissue. *Int J Legal Med* **110**: 155-158

75. Patel KP, Zimmermann GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM (1991): Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* **112**: 749-759

76. Pichler WJ, Peter HH (2006): Adhäsionsmoleküle. In: Siegenthaler W, Blum HE (2006): Klinische Pathophysiologie. *Thieme*: 488-493

77. Polak JM, Van Noorden S (1983): Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology. *Wright-PSG*

78. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD (2005): The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* **3**: 1590-1596

79. Ponthieux A, Herbeth B, Droesch S, Lambert D, Visvikis S (2003): Age and sex-related reference values for serum adhesion molecule concentrations in healthy individuals: intercellular adhesion molecule–1 and E-, P- and L-selectin. *Clin Chemie* **49**: 1544-1546

80. Reim M (1985): Conjunctiva (bulbi und tarsi). In: Reim M (1985): Augenheilkunde. *Thieme*: 22-25

81. Richard HW, Funk RHW (2003): Bindehaut, Tunica conjunctiva. In: Waldeyer A (2003): Anatomie des Menschen. *de Gruyter*: 583-585

82. Rose, NR, Bigazzi, PE (1980): Methods in immunodiagnosis: second edition. *John Wiley and sons*

83. Sachsenweger M (2002): Bulbus oculi (Augapfel). In: Sachsenweger M (2002): Augenheilkunde, Duale Reihe. *Thieme*: 4-11

84. Sachsenweger M (2002): Bindehaut (Konjunktiva). In: Sachsenweger M (2002): Augenheilkunde, Duale Reihe. *Thieme*: 73-99

85. Schmidt PH, Padosch SA, Madea B (2003): Alkoholintoxikation versus manuelle Halskompression. *Arch Kriminol* **212**: 165-175

86. Souter I, Janzen C, Martinez-Maza O, Breen EC, Stanzcyk F, Chaudhuri G, Nathan L (2005): Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule–1 are decreased in women receiving oral contraceptives compared with normally menstruating women: implications in atherosclerosis*. Fertil Steril* **83**: 1480-1488

87. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF (1985): A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* **101**: 880-886

88. Suzuma K, Manolai M, Kogishi J, Tojo SJ, Honda Y, Yoshikura N (1997): Role of P-selectin in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophtalmol Vis Sci* **38**: 1610-1618

89. Thommen R, Humar R, Misevic G (1997): PDGF-BB increases endothelial migration and cord movements during angiogenesis in vitro. *J Cell Biochem* **64**: 403-413

90. Turillazzi E, Karch SB, Neri M, Pomara C, Riezzo I, Fineschi V (2007): Confocal laser-scanning-microscopy. Using new technology to answer old questions in forensic investigations. *Int J Legal Med* **122**: 173-177

91. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991): Two step model of leukocyte-endothelial cell inter-

action in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7538-7542

92. von Hofmann ER (1876): Die forensisch wichtigsten Leichenerscheinungen. *Vjschr Gerichtl Med* **25**: 229-261

93. von Hofmann ER (1891): Der Leichenbefund bei Erstickten. In: von Hofmann ER (1891): Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. *Urban&-Schwarzenberg*: 503-517

94. Vonderheide RH, Tedder TF, Springer TA, Staunton DE (1994): Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4. *J Cell Biol* **125**: 215-222

95. Wang D, Huang H-JS, Kazlauskas A, Cavenee WK (1999): Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res* **59**: 1464-1472

96. Wynn TA, Hesse M, Sandler NG, Kaviratne M, Hoffmann KF, Chiaramonte MG, Reiman R, Cheever AW, Sypek JP, Mentink-Kane MM (2004): P-selectin suppresses hepatic inflammation and fibrosis in mice by regulating interferon gamma and the IL-13 decoy receptor. *Hepatology* **39**: 676-687

97. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B (1999): Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* **190**: 1769-1782

8 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Geburtsdatum	28. Mai 1981
Geburtsort	Friedrichroda, Deutschland
Geschlecht	weiblich
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1987-1990	Grundschule Östertal, Sondershausen
1990-1991	Erich-Kästner-Grundschule, Lich
1991-1997	Dietrich-Bonhoeffer-Gesamtschule, Lich
1997-2000	Theo-Koch-Gesamtschule, Grünberg
2000	**Abitur**, Ergebnis: **1.6**

Medizinische Ausbildung

09/2000–05/2007	Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Giessen
09/2002	**Physikum,** Ergebnis: **2.3**
08/2003	**1. Staatsexamen**, Ergebnis:**3.0**
04/2006	**2**. **Staatsexamen**, Ergebnis:**1.66**

04/2006-03/2007	**Praktisches Jahr:**
04/2006-08/2006	Innere Medizin; Asklepios Klinik, Lich
08/2006-11/2006	Chirurgie; Asklepios Klinik, Lich
12/2006-03/2007	Gynäkologie und Geburtshilfe; Kantonsspital Aarau, Schweiz
05/2007	**3. Staatsexamen**, Ergebnis:**1.0**
	Abschlussnote: **1.66**

Pflegepraktika und Famulaturen

03/2001	Chirurgie, J-L-U Giessen
08/2001	chirurgische Notaufnahme, JLU Giessen
03/2003	Anästhesie, Klinikum Lainz, Wien
03/2004	Rechtsmedizin, J-L-U Giessen
08/2004	Rechtsmedizin, J-L-U Giessen
02/2005	Orthopädie, J-L-U Giessen

Zusätzliche Qualifikationen

01/2004	Ausbildung zur Personal-Trainerin beim BDPT, Hamburg
04/2004	Ausbildung zur PNF-Trainerin, Hamburg
02/2005	Ausbildung zur Pilates–Trainerin, Dorsten
05/2005	Ausbildung zur Rehabilitations-Trainerin, Hammelburg

Praktische Tätigkeiten

seit 09/2000	Arbeit als Fitness-Trainerin
seit 06/2004	Arbeit als Personal-Trainerin
seit 03/2005	Arbeit als Pilates-Trainerin
seit 05/2005	Arbeit als Rehabilitations-Trainerin
seit 2004	Seminarleitung für Anatomie- und Physiologie-Seminare
seit 2004	selbstständige Tätigkeit im Catering-Service

Giessen, den 04.11.2007 Antje Wyß

10 VERZEICHNIS WISSENSCHAFTLICHER PUBLIKATIONEN

Wyss A, Lasczkowski G (2007): Vitality and age of conjunctival petechiae: The expression of P-selectin. *Forensic Sci Int*, eingereicht am 11.09.2007, akzeptiert am 29.01.2008

11 DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. med. Gabriele Lasczkowski für die langjährige Betreuung meiner Promotion und für die interessante Aufgabenstellung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Günter Weiler und seinen Mitarbeitern vom Institut für Rechtsmedizin sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Harald Schütz und seinen Mitarbeitern vom Institut für Forensische Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Giessen für die Anregungen, Gespräche und die Unterstützung, die sich auf die Durchführung der vorliegenden Arbeit positiv ausgewirkt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Nicole Graf, die mich während meiner experimentellen Arbeit unterstützte und bei Fragen und Problemen jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Ein großes Dankeschön für die Geduld und für die moralische Unterstützung gilt meinem Freund Johannes. Danke für deine stetige Motivation und deinen Optimismus, danke auch für deinen Trost in schlechten Zeiten.

Meinen Eltern Kerstin und Thomas Wyß bin ich dankbar für die Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben. Ich weiß, es war nicht immer leicht mit mir.

Mein ganz spezieller Dank gilt meiner Oma Christa, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation im Herzen begleitet hat. Danke für Alles, was du für mich getan hast.

Lieben Dank auch an alle meine Freunde, die mir geduldig zugehört haben. Ihr habt keinen einfachen Job gehabt. Vielen Dank Mirjam für die Zeit, die du in das Korrigieren meiner Arbeit investiert habt.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Was wäre ich ohne euch alle.

Ich habe diese Arbeit geschrieben in Gedenken an meine in diesem Jahr verstorbenen Großeltern Johanna und Wolfgang Wyß. Ihr habt mich beide bis zu eurem Tod in meinem Tun unterstützt und gefördert, habt mich geliebt und verstanden. Danke dafür.

Giessen, den 04.11.2007 Antje Wyß

12 ANHANG

Herstellung der Stamm- und Gebrauchslösungen

BSA-Lösung (5 %ig):

500mg BSA (Rinderserum – Albuminfraktion V, Fettsäure – frei; Roche)

10ml Tris-Puffer

Citrat-Puffer

Stammlösung A:

19,2g Zitronensäure

1000ml destilliertes Wasser

Stammlösung B:

29,41g Natriumcitrat

1000ml destilliertes Wasser

9ml Stammlösung A

41ml Stammlösung B

auf 500ml mit destilliertem Wasser auffüllen

EDTA-Puffer

> 99 % Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat

0,0005 % Schwermetalle (Pb)

0,372g auf 1000ml destilliertes Wasser

PBS-Puffer (ICN Biomedicals Inc. Cat. No.: 2810305)

1 Tablette auf 100ml destilliertes Wasser

Tris-Puffer (DAKO Cat. No.: S 1968)

1 Päckchen auf 5000ml destilliertes Wasser

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5381-8

9 783835 953819