

Präparatorische Methoden zur morphologischen Analyse vaskulärer Gefäßprozesse im Kopf-Hals-Bereich*

E. Böhm

Institut für Rechtsmedizin der Universität, Moorenstr. 5, D-4000 Düsseldorf 1,
Bundesrepublik Deutschland

Preparation Methods for Morphological Analysis of Vessel Alterations in the Neck

Summary. A technique is described for the preparation of combined morphological analyses of the arteries in the neck region: In situ fixation after opening of thorax and head and perfusion with electrolyte solution. Expansion of the vessel wall during the fixation by means of an especially elaborated experimental procedure. Presentation of a basis preparation for optimization and standardization of endothelial lesions, discussions to integrate the procedure into a medicolegal autopsy.

Key words: Preparation technique, arteries of the region of neck and head – Autopsy technique, region of neck and head

Zusammenfassung. Beschreibung einer Präparationstechnik für kombinierte morphologische Untersuchungen der Kopf-Halsarterien. In situ-Fixierung nach Eröffnung von Thorax und Schädelhöhle und Vorspülung mit Elektrolytlösung. Entfaltung des Gefäßrohrs während der Fixierungsduer durch eine besondere Versuchsanordnung. Erarbeitung einer Basis für vergleichende Untersuchungen bei Optimierung und Standardisierung der Versuchsbedingungen, Einbau der Technik in den Ablauf einer rechtsmedizinischen Obduktion.

Schlüsselwörter: Präparationstechnik, Arterien der Kopf-Hals-Region – Sektionstechnik, Kopf-Hals-Region

Einleitung

Die Untersuchung des Gefäßendothels mittels kombinierter morphologischer Technik hat sich in der Praxis weitgehend durchgesetzt. Gleichzeitig wurden

* Vorgetragen auf der 60. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Kiel, 1981

Schema 1. Gesamtkonzept. Erarbeitung einer Präparationstechnik zur zuverlässigen Erfassung forensisch-relevanter Gefäßprozesse im Kopf-Hals-Bereich

Grundprinzip

Einbau der Präparationstechnik in den Rahmen einer rechtsmedizinischen Obduktion

Voraussetzungen

1. Zeitlich und organisatorisch vertretbarer Umfang und Aufwand der Methodik, Einfachheit des Verfahrens
 2. Keine Störung des Obduktionsganges
 3. Keine wesentlichen Veränderungen an den üblichen Weichteilen, Organen und Körperflüssigkeiten, die Anlaß zu falscher oder ungeeigneter Befunderhebung sein könnten
 4. Vertretbarer Kostenaufwand
-

methodische Grenzen erkennbar, die vor allem durch erhebliche Präparationsartefakte charakterisiert sind. Als entscheidend werden die ersten Präparations schritte angesehen. Auf Übersichtsreferate und Einzelarbeiten von Buss und Hollweg (1977), Buss et al. (1976) sowie Hollweg und Buss (1980) für die REM-Technik kann hier verwiesen werden. Ausführliche Angaben zu Präparations techniken bei Rosenbauer (1978).

In früheren Arbeiten haben wir die von Frost et al. (1968) entwickelte Methode angewandt. Für großflächige Endothelpräparate war dieses für tierexperimentelle Untersuchungen entwickelte Vorgehen jedoch weniger geeignet, wie Untersuchungen an der Leiche ergaben. Insbesondere die intrakraniellen Gefäße zeigen bei inadäquater Präparationstechnik mechanisch bedingte Artefakte.

Wir hielten deshalb die Erarbeitung eines Präparationsverfahrens für erforderlich, das in den Rahmen einer rechtsmedizinischen Obduktion eingebaut werden kann. Die Voraussetzungen hierfür sind in Schema 1 aufgelistet. Vertretbarer Umfang und Aufwand, Vermeidung einer Störung des Obduktionsganges, zusätzlicher Veränderungen von Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten und geringe Kosten sind besonders hervzuheben.

Methodik

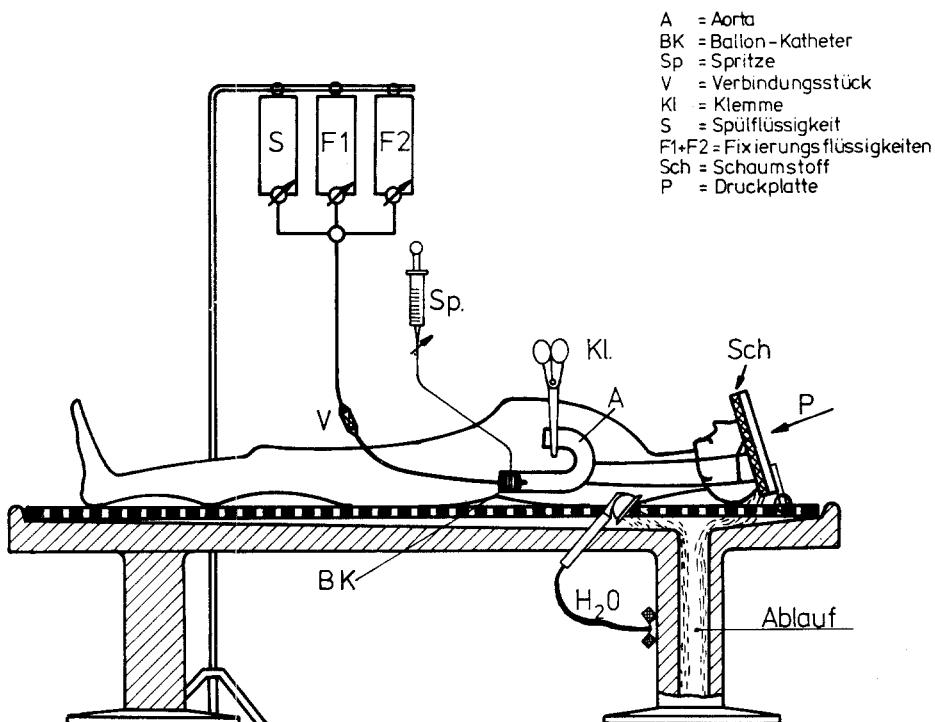
Die speziellen Anforderungen an die Präparationstechnik (Tabelle 1) bestehen darin, Blutbestandteile auszuspülen, vital entstandene Gerinnung dagegen in situ zu belassen, das Gefäßsystem unter physiologischen bzw. Niederdruckverhältnissen möglichst gut und rasch zu fixieren und mechanisch zu stabilisieren. Optimierung und Standardisierung von Perfusionsdruck und -fluß, Temperatur, Zeit und Zusammensetzung der Spül- und Fixierungsmedien sind erforderlich, um vergleichbare Befunde zu erhalten (Swinehart et al. 1976; Hollweg und Buss 1980). Die besonderen Gegebenheiten des Leichenmaterials waren zu berücksichtigen.

Es müssen also für das gesamte Vorgehen die Anforderungen makroskopischer, licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungstechniken Beachtung finden. Somit kam nur eine Perfusionsfixierung in Betracht, die u. a. wegen der Varianten des Vertebralabgangs über die Brustaorta vorzunehmen war (Abb. 1).

Zur Erreichung des gesetzten Präparations-Zieles haben wir folgendes Verfahren erarbeitet: Nach Eröffnung von Schädelhöhle (Tabelle 2) und dem Kappen des Gehirns in Sägeschnittebene erfolgt die Eröffnung der Brusthöhle. Die Brustaorta wird oberhalb des Herzens abgeklemmt, ein Trachealtubus in den absteigenden Teil unterhalb des Bogens eingeführt, die Tubusmanschette

Tabelle 1. Anforderungen an die Präparationstechnik

1. Ausspülung von Leichengerinnseln
2. Vermeidung einer Ablösung bzw. Auswaschung vitalen thrombo-embolischen Materials, z.B. von Mikrothromben des Gehirns
3. Fixierung und Stabilisierung des Gefäßsystems in situ unter physiologischen Druckverhältnissen
4. Optimierung und Standardisierung von Perfusionsdruck, Temperatur, Zeit und Zusammensetzung der Spül- und Fixierungsmedien
5. Berücksichtigung der Anforderungen makroskopischer, lichtoptischer und elektronenmikroskopischer Techniken

**Fig. 1.** Anordnung der Perfusionseinrichtung am Sektionstisch. Die Leiche befindet sich auf einer perforierten Metallplatte, die auch in halber Länge ausreichend ist

gefüllt, das System verriegelt und über den eingelegten Tubus mit Spülflüssigkeit perfundiert. Letztere erreicht über Carotis communis, interna und Vertebralarterien den Circulus arteriosus Wilisi und tritt in der Sägeschnittebene aus den Hirnarterien aus. Nach dem Auswaschen der Blutbestandteile wird der Schädel in der Schnittebene mit einer teildurchlässigen Dichtung aus Schaumstoff verschlossen, wodurch das Gefäßsystem bei der Perfusionsfixation entfaltet wird. Die Schaumstoffplatte ist mechanisch in einfacher Weise stabilisiert, wie die Abbildung zeigt.

Die Vorspülung wird mit Elektrolyt-Lösung (gepufferte Ringerlösung mit Rheomakrodex nach Knoche (1979) durchgeführt. Nach der Spülung wird das System mit zwei verschiedenen Fixierungsflüssigkeiten durchströmt, von denen die erste besonders gute Strukurerhaltung der Gefäßinnenschicht gewährleistet, die zweite rascher diffundiert und somit schneller mechanisch

Tabelle 2. Spezielle Präparationstechnik für Arterien der Kopf-Hals-Region

-
- 1a. Eröffnung der Schädelhöhle in typischer querer Sägeschnittrichtung, Kappen des Gehirns in Sägeschnittebene. Entfernen der oberen Hirnschnithälfte mit dem Schädeldach
 - 1b. Eröffnung von Thorax und Abdomen. Entnahme der Brust- und Bauchorgane nach Abdichten der Aorta oberhalb des Klappenansatzringes des Herzens
 2. Einlegen eines Trachealtubus in die Aorta, Aufblasen der Manschette, Verriegelung des Systems, Spülung von Aortenbogen, Hals- und Kopf-Arterien mit Elektrolytlösung unter freiem Abfluß des Lösungsmittels aus den eröffneten Schädelarterien
 3. Unvollständige Okklusion der Schädelkapsel durch apparativ fixiertes Schaumstoffpolster
 - 4a. Vorfixierung mit Glutaraldehyd-Lösung
 - 4b. Nachfixierung mit modifizierter Lösung nach Carnowsky
 5. Ausspülung der Fixierungsflüssigkeiten unter den Bedingungen von II
 6. Präparative Aufarbeitung des fixierten Materials für makroskopische, lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen
-

stabilisiert. Bei den Fixierungsflüssigkeiten handelt es sich um (1) Glutaraldehyd (2%) und (2) frisch aus Paraformaldehyd depolymerisiertes Formaldehyd (4%) (Karnovsky 1965), beide phosphatgepuffert (Sörensen-Puffer pH = 7,4). Fixierungstemperatur +4°C, Perfusionsdruck maximal 65 cm Wassersäule.

Nach der Fixierung wird das Gefäßsystem zur Entfernung von Rückständen erneut mit Spülflüssigkeit perfundiert.

Das vorgestellte Verfahren erfüllt die eingangs erhobenen Forderungen zum großen Teil. Insbesondere ermöglicht es die Reinigung und Fixierung der Gefäße unter physiologischen Druckverhältnissen *in situ*, wodurch Artefakte weitgehend vermieden werden.

Die mitgeteilte Technik ermöglicht die Umgehung des sogenannten No-reflow-Phänomens im Gehirn, einen Zustand reversibler postmortaler Kapillarokklusion. Dieser Block in der Endstrombahn kann im Normalfall nur durch massive Druckerhöhung im arteriellen System auf Werte über 200 mm Quecksilber gesprengt werden (Hossmann 1977), einem Druck, der u.a. zu schwersten Endothel-Schäden führen kann (Frenzel et al. 1976). Die mit der beschriebenen Methode erhaltenen Gefäßpräparate lassen sich in konventioneller Technik für morphologische Untersuchungen weiterverarbeiten. Eine radiologische Voruntersuchung kann nach der Fixation ohne Gefahr einer Endothel-Schädigung durchgeführt werden. Eine besonders interessante Variante stellt der Zusatz von Farbstoffindikatoren und „Tracer-Substanzen“ zu den Perfusionsmedien dar. Hierdurch lassen sich die *in situ*-Verhältnisse von Mikroläsionen, feinsten Gefäßverschlüssen, Sitz blutender Aneurysmen und dergleichen besonders gut darstellen.

Eine weitere praktisch wichtige Möglichkeit eröffnet sich für die Befunderhebung nach tödlichen Schädelhirntraumen, beispielsweise an zerrissenen Hirnbasisarterien. Subdurale Blutungen lassen sich bereits *in situ* auswaschen, Gefäße und Rupturstellen durch die oben erwähnten Markierungssubstanzen besser darstellen. Die Anfixierung des weichen Hirngewebes *in situ* erleichtert die artefaktarme Entnahme.

Diskussion

Wir haben die vorgestellte (von uns speziell entwickelte) Präparationstechnik bereits erfolgreich in den Gang mehrerer rechtsmedizinischer Obduktionen eingebaut und festgestellt, daß dies vom Aufbau her durchaus realisierbar ist (kürzeste Präparationszeit war 45 min bei 30 min Fixationsperfusion, mit zunehmender Anwendung wächst die Geschicklichkeit und verkürzt die erforderliche Präparations-

zeit). Langwierige Arbeiten werden zweckmäßigerweise am zurückbehaltenen nachfixierten Material vorgenommen.

Mit der Entwicklung der Methode sind keinesfalls alle Probleme bereits gelöst, auf Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden, es ist insbesondere jedoch darauf zu verweisen, daß die Endothel-Strukturen der Kopf-Hals-Gefäße des Menschen bisher noch nicht Gegenstand systematischer Untersuchungen geworden sind, insbesondere fehlen Mitteilungen über das postmortale Verhalten des Endothels unter den Bedingungen der Autolyse.

Das entscheidend Neue an der vorgestellten Technik ist die Reinigung und Fixierung des beschriebenen Gefäßsystems *in situ* unter Niederdruckperfusionsverhältnissen. Der Kapillarkreislauf des Gehirns ist hierbei von der Perfusion im Regelfall ausgeschlossen. Mit der Optimierung und Standardisierung der Präparationstechnik ergibt sich die Möglichkeit einer Vergleichbarkeit morphologischer Befunde am Gefäßsystem im Kopf-Hals-Bereich bei forensisch-medizinischen Fragestellungen.

Ein abschließender Hinweis betrifft die Präparation der im abgetrennten Schädeldach verbliebenen Hirnhälften. Zunächst ist festzustellen, daß deren Dimensionierung von den Gegebenheiten des Einzelfalles abhängig zu machen ist. So kann es vorteilhaft sein, zur Untersuchung der Basalgefäße die Schnittebene tief zu legen, d.h. einen hohen Dachanteil zu entfernen. Gleches gilt, sofern die Brückenvenen untersucht werden sollen, deren Bedeutung für die Entstehung subduraler Hämatome bekannt ist. Im letzteren Fall kann prinzipiell in gleicher Weise vorgegangen werden wie bei der Darstellung des arteriellen Systems. Wesentlich ist, daß bei der Perfusion des venösen Systems dessen physiologische Druckverhältnisse Beachtung finden müssen, der Druck somit nochmals drastisch reduziert und dem Systemdruck angepaßt werden muß. Die technische Applikation einer (weiten) Perfusionseinrichtung haben wir in ganz ähnlicher Weise wie arteriell durchgeführt, indem wir einen Katheter in den Sinus sagittalis superior eingeschoben haben, diesen befestigt und das System mit den gleichen Medien gespült und fixiert haben.

Wie bereits angesprochen, sind mit den vorgetragenen Methoden keinesfalls alle Probleme gelöst. Als nach wie vor unbefriedigend empfanden wir relativ hohe Verluste an Fixierungsmedien nach Eröffnung der Brusthöhle über kleine Seitenäste von Arterien. Bei erheblichem Hirndruck im ponto-cerebellaren Bereich wurde insbesondere die A. Basilaris nach der Fixierung wieder komprimiert — ein Phänomen, dem wir durch Änderung der Kopfstellung und Entlastungsschnitte am Tentoriumrand zu begegnen versuchten. Damit sind nur zwei Teilaufgaben angesprochen, die uns Schwierigkeiten bereiteten. Der erreichte Fortschritt ist jedoch bereits heute so eindeutig und groß gegenüber den üblichen Methoden, daß kleine Unvollkommenheiten und Störungen unbedeutend erscheinen müssen. Besonders die radiologische Nachuntersuchung der Halsorgane beim Strangulationstod ergab überraschende Befunde. Hierüber wird später berichtet werden.

Literatur

- Buss H, Hollweg HG (1977) Scanning electron microscopy of blood vessels: A review. *Scanning Electron Microsc* II:467-475
- Buss H, Klose JP, Hollweg HG (1976) Endothelial surfaces of renal, coronary, and cerebral arteries. *Scanning Electron Microsc* V:217-224
- Frenzel H, Kremer B, Richter I-E, Hücker H (1976) Der Einfluß des Perfusionsdruckes bei der Perfusionsfixierung auf die Feinstruktur der Lebersinusoiden. *TEM- und REM-Untersuchung*. *Res Exp Med (Berl)* 168:229-241
- Frost H, Hess H, Richter I (1968) Untersuchungen zur Pathogenese der arteriellen Verschlußkrankheiten. I. Eine neue Methode zum Studium der frühen Veränderungen auf der Gefäßwand. *Klin Wochenschr* 46:1099-1104
- Haudenschild CC, Gould KE (1979) Vascular organ cultures, prevention of endothelial damage. *Scanning Electron Microsc* III:865
- Hollweg HG, Buss H (1980) Problems with the preparation of blood vessels for SEM—A critical review. *Scanning* 3:3
- Hossmann KA (1977) Total ischemia of the brain. In: Zülch KJ (ed) *Brain and heart infarct*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 107
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde—Glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A-138A
- Knoche H (1979) *Leitfaden der histologischen Technik*. Fischer, Stuttgart New York
- Rosenbauer KH, Kegel BH (1978) *Rasterlektronenmikroskopische Technik*. Thieme, Stuttgart
- Swinehart PA, Bentley DL, Kardong K v (1976) Scanning electron microscopic study of the effects of pressure on the luminal surface of the rabbit aorta (I). *J Anat* 145:137-142

Eingegangen am 1. Oktober 1981