

Untersuchungen über die frühzeitige Erkennbarkeit von Hypoxieschäden am Kleinhirn mit Hilfe der Färbung nach Lie (HBFP-Färbung)

O. Pribilla und M. Tönnies

Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Lübeck,
Kahlhorstr. 31–35, D-2400 Lübeck, Bundesrepublik Deutschland

Studies on the Early Recognizability of Hypoxic Lesions in the Cerebellum by Use of the Lie Staining Method (HBFP Staining)

Summary. Using the Purkinje cells of the cerebellum from 42 rapidly and 28 slowly dying patients, we tried to find a correlation between the premortal hypoxie in brain and the result of HBFP staining. We found four different stages of staining and discuss here the causes of staining and false results.

Key words: HBFP staining – Brain hypoxie, Purkinje cell necrosis

Zusammenfassung. Anhand der Purkinjezellen des Kleinhirns von 42 schnell und 28 langsam gestorbenen Patienten wurde untersucht, ob eine prämortale Hypoxie im Gehirn je nach Überlebensdauer zu einem unterschiedlichen Ergebnis in der Färbung nach Lie (HBFP) führt. Es konnten vier Anfärbestadien unterschieden werden. Die Ursachen der Anfärbung und möglichen Artefakte werden diskutiert.

Schlüsselwörter: HBFP-Färbung (Lie-Färbung) – Gehirnhypoxie, Purkinje-Zellnekrose

Einleitung

Bis heute stehen keine Methoden zur Verfügung, die frühzeitig, zuverlässig und mit einfacher Technik ein morphologisches Äquivalent für eine Hirnhypoxie zeigen.

Alle bisher bekannten Methoden zum Hypoxienachweis wie Ansäuerung (McGinty und Gsell 1926; Funke 1859) bzw. Alkalisierung (Moos 1907; Borger et al. 1933), Phasenkontrastmikroskopische Veränderungen (Zollinger 1948), HE-Färbung und Nissl-Färbung (Scholz 1957; Peters 1958; Doerr 1974; Colmant 1965), elektronenmikroskopische Untersuchungen (Blinzinger und Hager 1962; Dzamoeva 1979), enzymhistochemische Untersuchungen (Colmant 1965) und Untersuchungen von Abbauproduktkonzentrationen (Saugstad und Schrader

Sonderdruckanfragen an: Prof. Dr. O. Pribilla (Adresse siehe oben)

1978) sind geeignete, aber in ihren Aussagen begrenzte Möglichkeiten, die z. T. nur durch spezielle Vorbehandlung (z. B. Perfusionfixation (Paladini et al. 1962; Cammermeyer 1962)) oder aufwendige Apparaturen anwendbar werden.

Lie (1971) zeigte am Herzmuskel, daß bei der HBFP-Färbung bereits 30 Min nach Abbinden einer Coronararterie eine positive Farbreaktion in dem nicht mehr durchbluteten Gebiet eintrat (Nekrosegebiete hellrot, gesunde Zellen hellbraun). Wir gingen der Frage nach, ob man mit der HBFP-Färbung an den besonders sauerstoffmangelempfindlichen Ganglienzellen (Doerr 1974; Büchner 1965), speziell den Purkinjezellen des Kleinhirns, ein ähnliches Verhalten nachweisen könnte.

Material und Methode

Als Material standen 700 Schnittpräparate von 200 Sektionen zur Verfügung. Die Sektionen fanden 1 bis maximal 2 Tage nach dem Tod bzw. Auffinden der Leiche statt. Rais und Jakobsen (1976) zeigen, daß ein falsch positiver Hypoxienachweis bei Lagerung der Leiche bei Zimmertemperatur schon nach einem Tag möglich ist. Ihre Untersuchungen an Ratten machen aber keine Aussage über die Veränderung einer positiven Färbung, wenn zu unterschiedlichen Zeitpunkten der postmortalen Abbauvorgänge aus dem gleichen Gewebe Proben entnommen werden. Pribilla und Weck (1982) wiesen hingegen nach, daß bei Herzmuskelnekrosen eine positive Lie-Färbung bis zum 3. Autolysegrad nachweisbar blieb. Die Ergebnisse von Rais lassen vermuten, daß ein positives HBFP-Bild immer dann erwartet werden kann, wenn die Färbung erst einen Tag nach dem Tod und zwischenzeitlicher Lagerung bei Zimmertemperatur erfolgt. Eine einmal aufgetretene Färbung müßte dann nach Pribilla und Weck bis zum 3. Autolysegrad nachweisbar bleiben. Das würde bei einem durchschnittlichen rechtsmedizinischen Sektionsgut eine fast vollständige Anfärbung der Zellen bedeuten, da die Leichen selten vor Ablauf von 24 h seziert werden und oft eine längere Zeit bei Zimmertemperatur liegen.

Die zu untersuchenden Präparate wurden aus fixierten Kleinhirnen gewonnen, indem man an vorher nicht definierten Stellen Gewebestücke von $1 \times 1 \times 1$ cm Kantenlänge entnahm, die danach in Paraffin eingebettet wurden. Aus diesen Blöcken wurden dann die Schnitte angefertigt und nach HBFP gefärbt (siehe Färbanleitung in Pribilla und Weck 1982). Als Kriterium für eine einwandfreie Technik wird die hellrote Färbung der Erythrozyten herangezogen.

Es handelte sich überwiegend um plötzliche, unnatürliche oder unklare Todesursachen. Anhand der Sektionsprotokolle wurden diese Fälle dann eingeteilt nach der vermutlichen Dauer der prämortalen Hirnhypoxie. Wir gingen davon aus, daß ein erhängter, dekapitierter, ertrunkener oder aufgrund einer Herzruptur Verstorbener nur eine minimale prämortale Hirnhypoxiezeit durchlitten hat, während bei einem Fall von Hirnstammblutung mit Atemlähmung, toxischem Herzversagen mit Koma über Stunden und Tage oder einer Intoxikation mit Koma eine längere Hirnhypoxie sehr viel wahrscheinlicher ist.

Da eine Zuordnung zu einer dieser Gruppen nicht in allen 250 Fällen möglich war, haben wir 42 Fälle mit sofortigem und 28 Fälle mit langsamem Tod ausgewählt, wobei allerdings auch in diesen Fällen eine gewisse Unsicherheit in der Zuordnung nicht auszuschließen war.

Die ausgewählten 70 Fälle wurden nach Lie (Bei dieser Färbemethode mit Hämatoxylin, basischem Fuchsin und Pikrin-Säure handelt es sich um eine nicht-enzymatische, nicht-chemische Technik), HE und Nissl gefärbt, um einen gleichmäßigen technischen Standard zu erreichen. Im allgemeinen wurden mindestens zwei Schnitte von jeder Färbung angefertigt, um technisch bedingte Fehler erkennen zu können. Aus Gründen der Objektivität erfolgte die Beurteilung in der HE und HBFP-Färbung in der Reihenfolge der Sektionsnummern. Die Nissel-Färbung diente nur in Zweifelsfällen als Hilfe bei der Beurteilung der HE-Färbung.

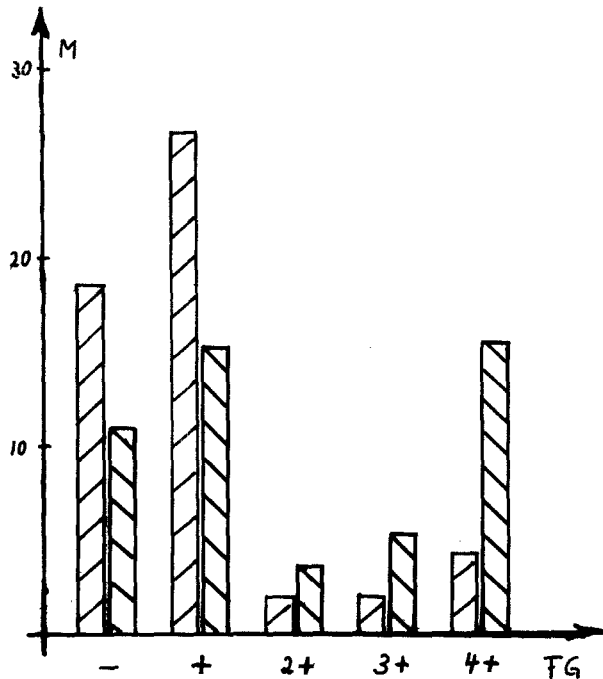


Abb. 1. Statistisches Färbeergebnis. ▨=hypoxische Fälle; ▤=nicht hypoxische Fälle; M=Mittelwert aus der Anzahl der gefundenen Zellen in den einzelnen Färbegruppen; FG=Färbegruppen

Ergebnisse

Bei der HE-Färbung lagen die bekannten Parameter wie Hyperchromasie, Zellschwellung, Zellschrumpfung, Kernverlust, ischämische Ganglienzellnekrose der Beurteilung der Präparate zugrunde. Bei der Lie-Färbung wurden unseres Wissens bis heute keine Beobachtungen an Nervenzellen gemacht. Autoren, die bisher mit HBFP-Präparaten arbeiteten, um Nekrosen nachzuweisen, haben immer eine Einteilung in Einzelzellnekrosen, Zellgruppennekrosen oder in ganze Nekrosegebiete (Pribilla und Weck 1982) vorgenommen. Dabei ging man von der Anfärbung der ganzen Zelle aus. Unsere Ergebnisse an den Purkinjezellen zeigten aber, daß sich die Rotfärbung in drei Stadien vom Nucleolus auf die Gesamtzelle ausbreitete.

Eine ähnlich differenzierte Zellfärbung hat auch Khan (1978) erstmals bei Populationen von Leberzellen beschrieben, deren Nucleoli unterschiedliches Färbeverhalten zeigten. Daher wurde die bloße Anfärbung des Nucleolus ebenfalls in die Bewertung der Ergebnisse einbezogen.

Bewertungsschema

- : keine Rotfärbung der Zellen oder ihrer Bestandteile,
- + : scharf begrenzte Rotfärbung nur des Nucleolus,

- 2+ : Ausbreitung der Rotfärbung vom Nucleolus auf den Gesamtkern und den Zelleib bei erhaltener Differenzierbarkeit von Nucleolus und Zelleib,
- 3+ : vollständige Rotfärbung der Zelle mit Auflösen der Grenzen zwischen Nucleolus und Zelleib,
- 4+ : undefinierbare Dunkelfärbung der Zelle, oft in Verbindung mit starker Zellverformung; keine Rotfärbung (Abb. 1).

Eine Einteilung in die Gruppen + bis 3+ war kein Problem. Da aber sowohl bei – als auch bei 4+ keine Rotfärbung zu sehen war und die Dunkelfärbung in Verbindung mit der Zellverformung nicht konstant war, sind bei letzteren ungewollte Überschneidungen möglich.

Fünfzig pro Präparat ausgezählte Purkinjezellen wurden zahlenmäßig obigem Schema zugeordnet. Da pro Fall unterschiedlich viele Präparate beurteilt wurden, haben wir die Anzahl der Zellen innerhalb der Färbegruppen addiert und anschließend einen Durchschnittswert errechnet. Anschließend wurden die Zahlen für die einzelnen Färbegruppen addiert und so die Gesamtzahl der –, +, 2+, 3+ und 4+ Zellen festgestellt. Der hieraus errechnete Mittelwert für die einzelnen Färbegruppen wurde graphisch dargestellt.

Es zeigt sich, daß sowohl bei den „hypoxischen“ als auch bei den „sofort toten“ Patienten ein Färbemaximum bei + und 4+ liegt, mit einem Minimum bei 2+. In beiden Gruppen ist die Zahl der – geringer als die der +. Ab 2+ steigt dann die Zahl der gefundenen Zellen wieder an. In den Spalten – und + ist der Mittelwert der beobachteten Zellen aus der Gruppe der „hypoxischen“ größer als derjenige der „sofort toten“. Bei den letzteren erscheinen dafür vermehrt Zellen in den Spalten 2+ bis 4+. Auch wenn man, um Überschneidungen zwischen – und 4+ zu vermeiden, diese Spalten nicht in die Überlegung einbezieht, ändert sich das Bild nicht.

Bei der Beurteilung der Einzelkasuistik fällt auf, daß es keine offenkundige, klare Zuordnung zwischen der erwarteten Hypoxiedauer und dem jeweiligen Bild in der Lie-, bzw. HE-Färbung gab. Vermutlich hypoxische Fälle zeigten ein fast unverändertes Bild, während andere, sicher schnell gestorbene Patienten starke Veränderungen zeigten. Allerdings gibt es auch jeweils Gegenbeispiele.

Diskussion

Daraus ergibt sich die Frage nach dem färbbaren Stoff in der Zelle. Außerdem steht zur Diskussion, ob dieser Stoff in seiner Existenz abhängig ist von einer vorangegangenen Hypoxie und damit spezifisch wäre für entsprechende Schäden.

Lie et al. (1971) glaubten an ein instabiles Protein oder einen Protein-Phospholipidkomplex als eigentlichen Farbträger, während Scherer und Masi (1975) eher eine „intrinsic muscle substance“ als ein Produkt der Diffusion dafür verantwortlich machten. Ihrer Meinung nach zeigte die HBFP-Färbung frühe vornekrotische Zustände von Muskelschäden, die sich nach Eintritt der Nekrose nicht mehr zeigten. Dabei sei die Färbung nicht spezifisch für eine bestimmte Schädigungsform, z.B. Ischämie.

Bis 1977 wurde die Färbemethode nur am Herzen und an quergestreifter Muskulatur angewendet. Dann veröffentlichte Khan 1978 eine Untersuchung an Leberzellen und fand zwei unterschiedlich gefärbte Zellkernpopulationen, z.T. sogar in einer Zelle. Diese Färbeunterschiede wies er auch an isolierten Zellkernen nach. Er arbeitete 1979 über den möglichen Mechanismus der HBFP-Färbung. (Khan und Eberhardt 1979) Er stellte fest, daß die Rotfärbung der Nucleoli durch eine Vorbehandlung mit DNase oder Bonins Flüssigkeit im Gegensatz zur Behandlung mit RNase völlig zum Verschwinden gebracht werden kann, ohne daß dabei die DNA gänzlich entfernt wird. Auch Proteasenvorbehandlung verhindere eine Rotfärbung, während DNA noch deutlich nachgewiesen werden könne. Daraus schloß Khan, es müsse sich um ein DNA-assoziiertes Protein handeln, das für die Nucleolusfärbung verantwortlich sei.

Khans Beobachtungen stimmen mit unseren Ergebnissen überein, die die Färbbarkeit der Nervenzellen beweisen und zeigen, daß diese im Nucleolus beginnt und sich über die ganze Zelle ausbreitet, um offenbar von einem bestimmten Zeitpunkt an zu verschwinden. Jakob beschrieb 1963, daß gelegentlich mit der Klüver-Färbung eine ausschließlich auf den Nucleolus beschränkte grün-blau-Färbung zu beobachten sei.

Er deutete das als Zeichen dafür, daß der Sauerstoffmangel am Nucleolus beginne. Eine Ausbreitung der Nekrose über den Zelleib hinaus auf die Zellfortsätze rechnet er nicht mehr zu den ischämischen Veränderungen, sondern zu der zu einem späteren Zeitpunkt eintretenden „total cellular necrobiosis“.

Wir sahen in der HBFP-Färbung an Purkinjezellen zu keinem Zeitpunkt eine Anfärbung der Neuriten oder Dendriten. Deren Nekrose scheint also zu einem Zeitpunkt vor sich zu gehen, an dem die Lie-Färbung nicht mehr positiv reagiert, oder sie enthalten nicht die färbbare Substanz wie der Zellkern. Veränderungen sehr leichter Art (Rotfärbung ausschließlich des Nucleolus) entstehen auch dann, wenn der Kreislauf sofort sistiert und die Zellen keine Möglichkeit haben, vitale Veränderungen zu entwickeln. Würde der langsame Verbrauch des Restsauerstoffs im Blut für diese Farbreaktion ausreichen, müßten sich die Zellen immer anfärben, ausgenommen evtl. beim Verbluten. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf Khan verwiesen, der Nucleolifärbung in der Leber auch ohne Hypoxie fand und sie offenbar zu den normalen, nicht pathologischen Veränderungen zählt. Daraus ergibt sich die Frage, ob es, wie in der Leber, ein differenziertes Färbeverhalten der Purkinjezellen unabhängig von einer vorausgegangenen Hypoxie gibt.

Übereinstimmend mit anderen Autoren stellten Pribilla und Weck 1982 fest, daß am Herzen nur so lange mit einer positiven Färbung nach Lie gerechnet werden kann, bis sich die Nekrosen auch im HE-Bild darstellen. Dann verschwindet die Rotfärbung. Ein Zusammentreffen von positiven Färbungen nach beiden Techniken kann es danach an einer Zelle nicht geben. Unsere Ergebnisse an Purkinjezellen widersprechen diesen bisherigen Erfahrungen. In zwei Fällen konnte durch Serienschnitte gezeigt werden, daß bei drei Purkinjezellen, die auf Windungskuppen lagen, eine Lie-Färbung von 3+ zusammenfiel mit einer totalen Zellschrumpfung und Homogenisierung der Zellen im HE-Bild. Diese Befunde blieben Einzelfälle aufgrund der technischen Probleme, solche Schnitte gezielt herzustellen.

Außer in diesen beiden besonderen Fällen konnte auch in anderen Purkinje-zellfärbungen nach Lie ein Nebeneinander der beiden positiven Farbreaktionen gefunden werden. In den Fällen, in denen die Überlebenszeit größer als 6 bis 8 h war, kann man diese Beobachtung sicher damit erklären, daß die zuerst abgestorbenen Zellen schon in der HE-Färbung, die später abgestorbenen in den verschiedenen Stadien der Lie-Färbung erscheinen. Erklärbar sind damit nicht die Fälle, in denen eine so lange Überlebenszeit ausgeschlossen erscheint.

Häufiger wurde beobachtet, daß — unabhängig vom HE-Bild — die stark nach Lie gefärbten Zellen vermehrt auf den Windungskuppen lagen, ohne daß dort auch gleichzeitig der Präparaterand lag. Daher haben wir diesen Befund nicht als technischen Artefakt gewertet. Besonders deutlich wurde dieser Befund bei einem Patienten mit innerem Verbluten und multiplen Verletzungen, u.a. auch einem subduralen Hämatom. Bei der Beurteilung fanden sich 16 3+Zellen und 34 4+Zellen, wobei die 3+Zellen ausschließlich auf den Windungskuppen lagen, die anderen (schon wieder?) ungefärbten Zellen dagegen in den Tiefen der Windungen.

Eine durch das Trauma ausgelöste mechanische Irritation dieser Zellen kann aber nicht ausgeschlossen werden. Bei der HE-Färbung (Scharrer 1933; Cox 1937; Cotte 1957; Koenig 1960; Cammermeyer 1960, 1962) und bei der Elektronenmikroskopie (Blinzinger und Hager 1962) sind Artefakte durch mechanische Irritationen bekannt. Ebenso fanden Rajs und Jakobsen (1976) durch Ligatur der Coronararterien bedingte Rotfärbungen der angrenzenden Myokardfasern. Prämortale mechanische Artefakte scheinen daher falsch positive HBFP-Färbeergebnisse verursachen zu können.

Bei der Lie-Färbung werden technisch bedingte Fehler beschrieben, wie z.B. ungenaues Entfärben bei der Ausarbeitung der Schnitte (Scherer und Masi 1975). Zum Ausschluß solcher Fehler haben Pribilla und Weck (1982) die Färbemethode standardisiert und damit die Voraussetzung für vergleichbare Ergebnisse geschaffen.

Literatur

- Blinzinger K, Hager H (1962) Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Feinstruktur ruhender und progressiver Mikorgliazellen im Säugetierhirn. *Beitr Pathol Anat* 127: 173–192
- Borger T, Peters T, Kurz M (1933) Untersuchungen zur pathologischen Physiologie des Infarktes. 1. Der Gehalt des Infarktgewebes an reduziertem Glutathion und anderen Sulfhydrylgruppen. *Hoppe-Seylers Z Physiol* 217: 255–273
- Büchner F (1965) *Spezielle Pathologie*, 4. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München Berlin, S 478
- Cammermeyer J (1960) A critique of neuronal hyperchromatosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 19: 141f
- Cammermeyer J (1961) The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 1: 245–270
- Cammermeyer J (1962) An evaluation of the significance of the "dark" neuron. *Ergeb Anat Entwickl Gesch* 6: 2–61
- Colmant HJ (1965) *Cerebrale Hypoxie*. Thieme, Stuttgart, Heft 16
- Cotte G (1957) Etude critique de la signification de l'état hyperchromophile des cellules nerveuses. *Arch Biol (Liège)* 68: 297–380

- Cox A (1937) Ganglienzellschrumpfung im tierischen Gehirn. *Beitr Pathol Anat* 98 : 399–409
- Doerr Wilhelm (1974) *Organpathologie*, Bd III. Thieme, Stuttgart
- Dzamoewa EI (1979) Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on fine structure of neuroglia of the rabbit cerebral cortex. *Neuropathol Pol* 17 : 369–378
- Funke (1859) Zit. nach Winterstein (1928). In: Colmant HJ (1965) *Cerebrale Hypoxie*. Thieme, Stuttgart
- Jakob H (1963) CNS tissue and cellular pathology in hypoxiaemic states. In: Schadé HP, McMenemy WN (eds) *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Oxford
- Khan MA (1978) Heterogeneous staining of rat hepatocyte nuclei by HBFP-technique. *Histochem J* 10 : 641–644
- Khan MA, Eberhardt NH (1979) On the mechanism of the HBFP stain and an analysis of the heterogeneous nuclei in rat hepatocytes. *Acta Histochem (Jena)* 65 : 146–150
- Koenig (1960) *J Neuropathol Exp Neurol* 19 : 141
- Lie JT, Holley KE, Kampa WR, Titus IL (1971) New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Mayo Clin Proc* 46 : 319–327
- McGinty DA, Gsell R (1926) On the chemical regulation of respiration. *Am J Physiol* 75 : 70–83
- Moos M (1907) Beitrag zur Kenntnis des Nierensequesters mit besonderer Berücksichtigung der Weigert'schen Lehre von der Koagulationsnekrose. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 195 : 273–317
- Palladini G, Conforti A, Medolago-Albani L (1976) Ultrastructural hypoxic changes in Ammon's horn and Purkinje cells. *Brain Res* 103 : 45–56
- Peters G (1958) Allgemeine Reaktionen und „Degenerationen“ In: Kaufmann E, Staemler M (Hrsg) *Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie*. De Gruyter, Berlin, S 104
- Pribilla O, Weck S (1982) Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit, Aussagekraft und Autolyseresistenz der HBFP-Färbung nach Lie zum Nachweis des frischen Herzinfarctes. *Beitr. Gerichtl Med* 40 : 521–532
- Rajs J, Jakobsen S (1976) Experiences with the haematoxylin basic fuchsin-picrid acid staining method for morphologic diagnosis of myocardial ischemia — an experimental study in forensic pathology. *Forensic Sci* 8 : 37–48
- Saugstad OD, Schrader H (1978) The determination of inosin and hypoxanthin in the rat brain during normothermic and hypothermic anoxia. *Acta Neurol Scand* 57 : 281–288
- Scharrer E (1933) Bemerkungen zur Frage der „sklerotischen“ Zellen im Tiergehirn. *Z Ges Neurol Psychiatr* 143 : 773–777
- Scherer AT, Masi AT (1975) Technical aspects of the haematoxylin basic fuchsin picrid acid stain applied to skeletal muscle. *Histochem J* 7 : 335–341
- Scholz W (1957) *Handbuch spezielle Anatomie Histologie*. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg, XIII/1. S 28 ff, 43 ff, 1326 ff
- Tewari HB, Bourne GH (1960) Neuroceratin network of the peripheral nerve myelin sheath as a centre of metabolic activity. *Nature (Lond)* 186 : 695
- Zollinger HU (1948) Phasenmikroskopische Untersuchungen über den Zelltod. *Schweiz Z Pathol* 11 : 276–282

Eingegangen am 25. Mai 1983