

## 11. Untersuchungsmaterial und Methoden

Grundlage für die morphologischen, morphometrischen und statistischen Aussagen bildete das Sektionsgut der Institute für Rechtsmedizin Berlin (jetzt Campus Benjamin Franklin und Campus Charité Mitte 1999 - 2003). Zusätzlich wurden ausgewählte Fälle aus dem Sektionsgut des Landesinstitutes für gerichtliche und soziale Medizin Berlin und des Deutschen Herzzentrums Berlin untersucht.

### 11.1. Vergleichskollektiv

103 Todesfälle aus dem laufenden Obduktionsgut mit aorten-unabhängigen Todesursachen, bei denen autoptisch sowohl natürliche als auch nichtnatürliche Todesarten festgestellt wurden, dienten als Basisdaten. Das insgesamt prospektiv gewonnene Untersuchungsmaterial wurde aus definierten Regionen der Aorta entnommen (Abb. 11a-c). Nach der Materialentnahme wurden die Proben auf eine glatte Unterlage (Styropor) aufgetragen und in Formalin (4% gepuffert) fixiert. Vor dem Zuschnitt der Gewebeproben erfolgte eine makroskopische Erfassung der arteriosklerotischen Wandveränderungen sowie Aortenumfangsmessungen der Ao.th.asc., Ao.th.desc. und Ao.abdominalis. Bei der Auswahl der Aortenwandproben in dieser Gruppe wurde schwerpunktmäßig das mittlere Lebensalter berücksichtigt und makroskopisch auf möglichst geringe arteriosklerotische Wandveränderungen geachtet.

### 11.2 Erkrankungsfälle

36 Todesfälle durch Ruptur einer Aortendissektion, eines Aortenaneurysmas ohne wesentliche Dissektion und Todesfälle, bei denen die Aortendissektion einen „Nebenbefund“ darstellte. Hierbei handelt es sich einerseits um prospektiv, andererseits um retrospektiv aufgearbeitetes Untersuchungsmaterial. Bei den prospektiv untersuchten Fällen wurden die Gewebeproben aus gleichen Regionen wie bei dem Vergleichskollektiv gewonnen; bei dem retrospektiv aufgearbeiteten Material konnten nur einzelne Regionen untersucht werden.

### 11.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

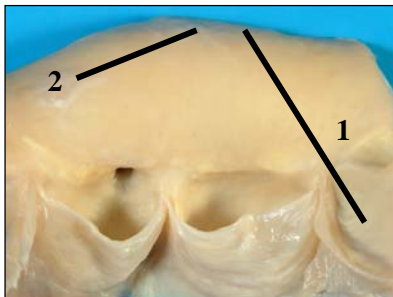


Abb. 12a

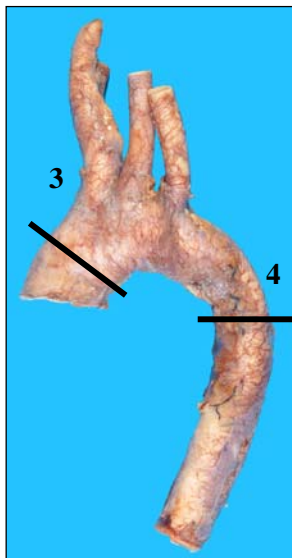


Abb. 12b

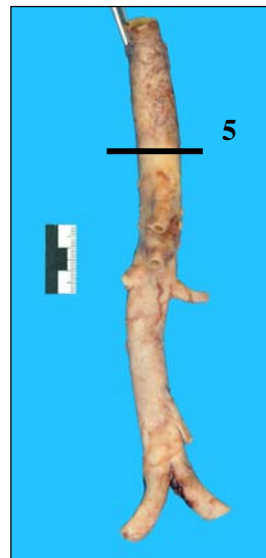


Abb. 12c

Die Abb. 12a-c zeigen die Regionen, an denen die Aortenwandproben entnommen wurden:

- 1** Ao.th. asc. längs (mit Anteilen der Valvula aortae )
- 2** Ao.th.asc. quer (2 cm über der Valvula aortae)
- 3** Ao.th.asc. quer (vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus)
- 4** Ao.th. desc. quer (distal des Abganges der Arteria subclavia sin.)
- 5** Ao.abd. quer, (5 cm über dem Abgang der Aa. renales)

Da die Aorta thoracica ascendens der Aortenabschnitt war, der bei den untersuchten Erkrankungen betroffen ist und dem daher besonderes Interesse galt, erfolgten hier die Probenentnahmen an mehreren Stellen (Probe **1 – 3**). An Lokalisation **1** wurde ein Längsschnitt, an den anderen Lokalisationen Querschnitte entnommen.

Die morphometrischen Untersuchungen wurden im Arbeitsbereich Herzpathologie im Deutschen Herzzentrum Berlin an einem speziellen Messplatz durchgeführt.

#### 11.4 Verwendete Geräte und Software, Datenverarbeitung

- Durchlichtmikroskop Axioskop 1 (Carl Zeiss)
- 3CCD-Kamera MC3214 (AVT-Horn/Sony)
- Workstation mit NT4 SPA6a und Frame Grabber Matrox Meteor (INTEQ GmbH Berlin)
- Modulare Bildanalysesoftware KS 400 Release 3.0 (Carl Zeiss Vision)
- Microsoft Excel 97

Aus den erhobenen Befunden und Messergebnissen wurde eine Datendatei (SPSS) erstellt.

Die statistische Bearbeitung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (Campus Benjamin Franklin) mittels des Statistikprogramms SPSS für Windows, Version 11.5.1..

Neben der deskriptiven Statistik wurden in der analytischen Statistik nichtparametrische Tests durchgeführt: Der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben erfolgte mittels U-Test nach Mann und Whitney; beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet.

Der Vergleich von zwei abhängigen Stichproben erfolgte durch den Wilcoxon-Test, mehr als zwei abhängige Stichproben wurden mittels des Friedman-Testes verglichen. Als Irrtumswahrscheinlichkeit galt  $p \leq 0,01$ .

Bei der Prüfung von Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Die Parameter wurden histomorphometrisch sowohl im Vergleichskollektiv als auch bei den Aortenwunderkrankungen an oben definierten Lokalisationen der Aortenmedia untersucht. Der prozentuale Kollagengehalt wurde an verschiedenen Regionen der T. media bestimmt, hier wurde bei den Messungen unterschieden zwischen innerer und äußerer Mediahälfte.

### 11.5 Angewandte morphometrische Verfahren

*Relativer Anteil des kollagenen Bindegewebes (in Prozent)* der Aortenmedia jeweils in der inneren und äußeren Mediahälfte. Die Untersuchungen wurden an nach van Gieson gefärbten Präparaten vorgenommen. Sie erfolgten über das speziell entwickelte KS 400- Makroprogramm BW 7 mit folgenden Mikroskopeinstellungen: Durchlicht Hellfeld, Objektiv 20x, Zoomfaktor:1,0, 11,5 V Lampenspannung, beide eingebaute Graufilter im Strahlengang. Die Messung des relativen (prozentualen) Anteils kollagenen Bindegewebes der Tunica media erfolgte über eine halbautomatische Analyse. Voraussetzung war ein kontrastreiches gleichmäßig gefärbtes Präparat bei dem die Scharfeinstellung am Bildschirm ausschlaggebend war (Abb. 13a), nicht der Blick durch das Okular. Zunächst erfolgte durch Teaching der HLS-Werte (Hue-Lightness-Saturation-Werte, Abb. 13b) unter manueller Kontrolle die Farbsegmentierung. Für die Auswertung wurden  $1 \text{ mm}^2$  als Referenzfläche definiert, wofür 12 Bildfelder jeweils auszuwerten waren (automatische Abbruchbedingung). Die automatischen Messungen erfolgten dann jeweils nach nochmaliger Kontrolle der Segmentierung (Abb. 13c). Die Messungen dieses Parameters wurden in der inneren und äußeren Mediahälfte durchgeführt.

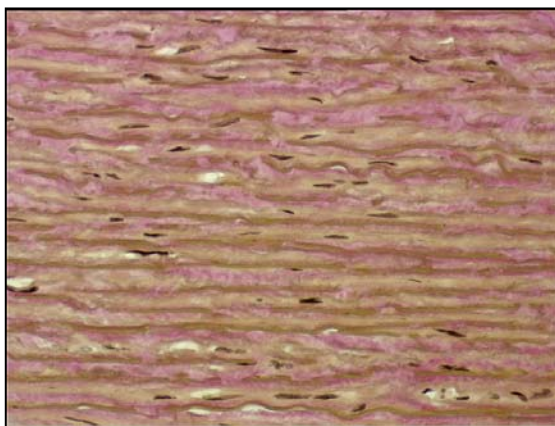


Abb. 13a

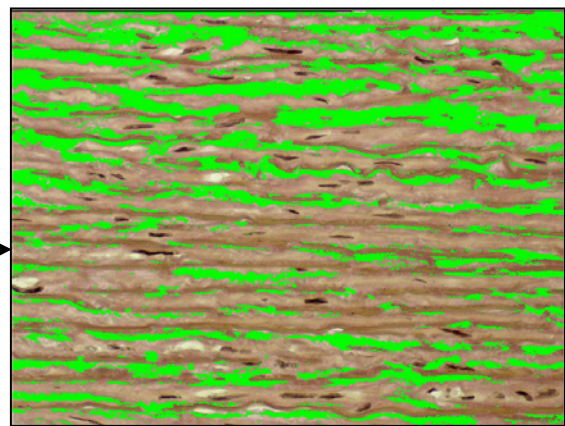


Abb. 13b

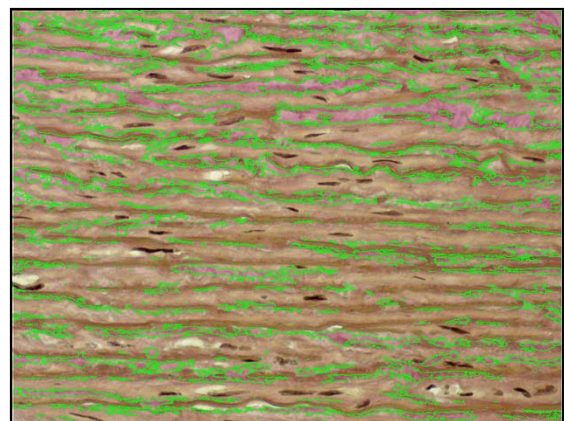


Abb. 13c

Die Abbildungen zeigen das auf dem Monitor wiedergegebene Bild. Nach Einstellung des Bildfeldes am Mikroskop und Scharfeinstellung am Bildschirm (Abb. 13a) erfolgte das Anlernen des Systems auf die Segmentierungsfarbe (Abb. 13b, hellgrün markiert) und nochmalige Kontrolle der Segmentierung (Abb. 13c), ehe die (automatisch voreingestellten) 12 Messungen erfolgten. Die Daten wurden automatisch in eine Excel-Tabelle exportiert.



*Stärke der elastischen Lamellen und Breite der interlamellären Räume (in  $\mu\text{m}$ ):*

Die Messungen erfolgten an Elastica - van Gieson gefärbten Präparaten mit dem KS400-Makroprogramm AO 2. Die Parameter wurden in direkt hintereinander ablaufenden Prozessen bestimmt. Die in die Auswertung eingegangenen Werte basierten auf 10 Einzelmessungen, in denen jeweils entsprechend der Liniendistanz an mehreren Punkten die Messungen durchgeführt wurden, so dass eine erhöhte Anzahl von Messwerten in die Untersuchung eingingen. Die Messungen erfolgten mit folgenden Mikroskop- bzw. Kameraeinstellungen: Durchlicht Hellfeld, Objektiv: 20x, Zoomfaktor: 1,0, Lampenspannung: 11V, Kondensor: 0,5. Die Liniendistanz für die Abmessung in Y betrug: 10 Pixel.

Nach Einstellung des Bildfeldes, in dem die elastischen Lamellen senkrecht ausgerichtet sein mussten (Abb. 14a), erfolgte durch offset-Korrektur die Markierung der elastischen Lamellen und durch Anlegen eines Messrahmens die Bestimmung der Größe des Messfeldes. Bewährt hat sich, die Vermessung des gesamten Bildfeldes, wenn es sich um ein homogenes, artefaktfreies Bild handelte; war das nicht der Fall, wurde der Messrahmen an entsprechenden Regionen positioniert. Es wurden sowohl die Breite der elastischen Lamellen als auch die Breite der interlamellären Räume unmittelbar in zwei aufeinanderfolgenden Messvorgängen bestimmt. Nach 10 Messvorgängen erfolgte der Export der Daten in eine Excel-Datentabelle. Diese enthielt nicht nur die gemessenen Werte sondern auch die Anzahl der Messpunkte.

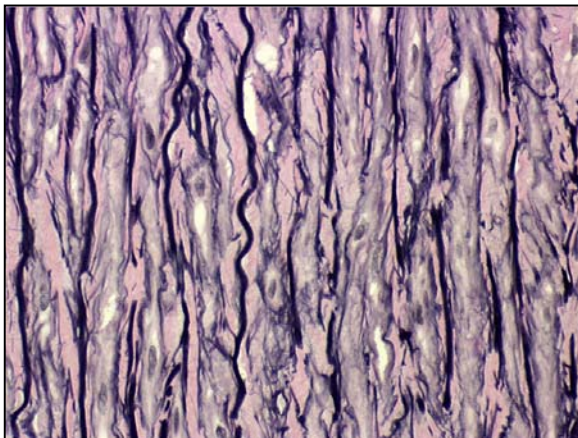


Abb. 14a

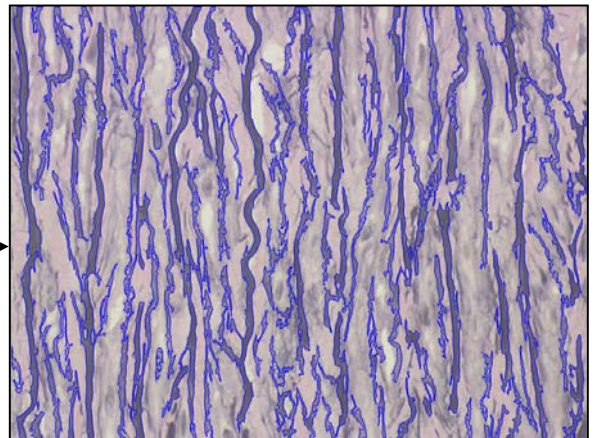
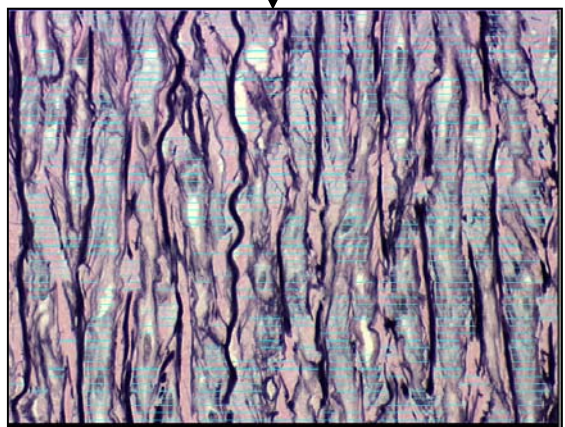


Abb. 14b

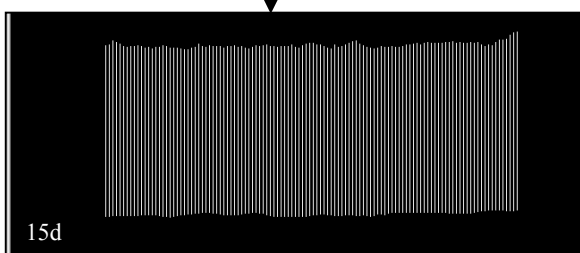
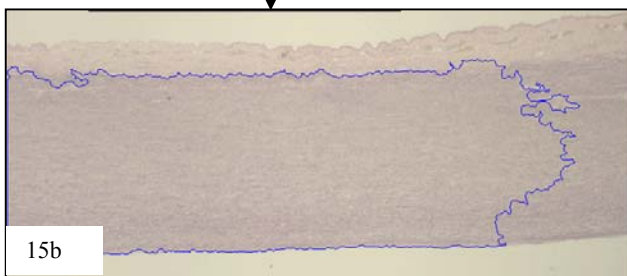
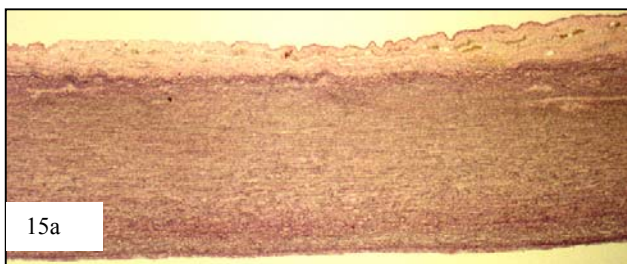
Nach Einstellung des Bildes (Abb. 14a) und Markierung der elastischen Lamellen (Abb.14b) erfolgt die Vermessung der Breite der Lamellen (ohne Abb.) und die sich unmittelbar anschließende Messung der Breite der interlamellären Räume entsprechend Abb.14c

Abb. 14 c



*Breite der Aortenmedia (in mm):*

Die Untersuchungen erfolgte an Elastica - van Gieson gefärbten Präparaten mit dem KS400-Makroprogramm Th 2 im Binärbild. Folgende Mikroskopeinstellungen wurden verwendet: Objektiv: 1,25x, Zoom 0,5, d.h. die Untersuchung erfolgte mit dem größtmöglichen Bildfeld (Abb. 15a), Lampenspannung: 6-7 V. Die in die Auswertung eingegangenen Daten resultierten aus 5 Messungen an verschiedenen Stellen des Präparates. Die T. media wurde segmentiert (Abb. 15b), vor dem eigentlichen Messgang war eine interaktive Korrektur möglich (wenn erforderlich, hier ohne Abbildung). Ausgewählt bzw. eingestellt wurde eine horizontale Ausrichtung des Präparates, in der die Mediabreite gemessen werden sollte (Abb. 15c). Aufgrund der festgelegten Liniendistanz (in Pixel) wurden in dem ausgewählten Bildfeld mehrere Einzelmessungen (Abb. 15 d). Vermessen wurden 5 verschiedene Regionen des Präparates. Nach Abschluss der Messungen erfolgte automatisch der Export der Daten in eine Excel-Tabelle, in der ebenfalls die gemessene Länge in mm und die Messpunkte /mm registriert wurden.



Nach der Bildeinstellung (Abb. 15a) erfolgte die Segmentierung der Tunica media (Abb. 15b).

Nach dem Schritt war, wenn erforderlich, eine interaktive Korrektur (ohne Abbildung) möglich.

Anschließend erfolgte die Auswahl der Messregion (Abb. 15c), dabei war zu beachten, dass der Abschnitt, der vermessen werden sollte, horizontal ausgerichtet war. Dann folgte der automatisierte Messvorgang (Abb. 15d).

Die Messungen erfolgten an 5 verschiedenen Stellen des Präparates, die Daten wurden automatisch in eine Excel-Datei exportiert.

## 11.6 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die konventionellen lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an maximal 2 - 3 µm dicken Schnitten der angegebenen Färbungen und Nachweisreaktionen, orientiert an den von Schlatmann und Becker erarbeiteten Kriterien. Ausgenommen wurde hier der Kollagengehalt, der nur morphometrisch bestimmt wurde.

Im histologischen Labor des Arbeitsbereiches Herzpathologie im Deutschen Herzzentrum Berlin wurden alle histologischen Schnittpräparate angefertigt. Nach Routineverfahren wurden die Aortenwandproben in Paraffinkassetten aufbereitet und histologische Schnittpräparate folgender Färbungen und Reaktionen gefertigt (Anhang):

- Übersichtsfärbung (Hämalaun-Eosin)
- van Gieson
- Elastica van Gieson,
- Alcianblau-PAS
- Alcianblau-van Gieson
- PAS sowie die
- immunhistochemische Darstellung von  $\alpha$ -Aktin.
- bei den „Rupturfällen“ erfolgte die Berliner Blau Färbung.

## 11.7 Allgemeine Datenerfassung

Für alle Untersuchungskollektive wurden epidemiologische Daten wie Geschlecht, Alter, Körpergröße und Körpergewicht, Body-Mass-Index, Todesursache/Todesart, Herzgewicht, Aortenklappen- und Aortenumfang (wenn möglich), makroskopische Beschreibung der Aortenwandveränderungen und die konventionell histologischen Untersuchungsbefunde der Aortenwand erfasst.

Bei den Aortenwanderingkrankungen zusätzlich erhobene Befunde zur Klassifikationen der Aortenwandveränderung (nach DeBakey, Stanford und Crawford), Lokalisation und Ausmaß der Ruptur, Lokalisation und Volumen der Blutung, Todesumstände, klinische Symptomatik, Überlebenszeiten, durchgeführte diagnostische und therapeutische Maßnahmen und Verdachtsdiagnosen sowie forensische Aspekte wie die Gründe der kriminalpolizeilichen Untersuchungen gingen in die Auswertung ein.

Einzelbefunde wurden fotodokumentiert.