

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H.-D. Wehner

**Eingrenzung der Leichenliegezeit
mittels immunhistochemischem Nachweis
von Cystatin C in der Nebenniere**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingeborg Britta Claßen
aus
Stuttgart

2006

Dekan: Professor Dr. Claus D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-D. Wehner
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Dietz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Postmortale, zeitabhängige Prozesse	1
1.2 Cystatin C	7
1.3 Untersuchungsziel	12
2. Material und Methodik	13
2.1 Material aus den Asservaten des Instituts	13
2.2 Tierkadaver	14
2.3 Histologische und immunhistochemische Methoden	15
2.3.1 Histologie	15
2.3.2 Immunhistochemie	15
2.3.3 Reagenzien	17
2.4 Versuchsplanung und Auswertung	18
3. Ergebnisse	24
3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Cystatin C in der Nebenniere	24
3.2 Postmortale, zeitabhängige Abnahme der Anfärbbarkeit von Cystatin C	27
3.2.1 Humanorgane	27
3.2.2 Biometrische Auswertung	31
3.2.3 Tierorgane	40
4. Diskussion	43
4.1 Ergebnisse und Literatur zum Thema	43
4.2 Zu Fragestellung und Methodik	46
4.3 Zu den Untersuchungsergebnissen	47
4.4 Schlussfolgerung aus der Arbeit	49
5. Zusammenfassung	51
	IV

6. Literaturverzeichnis	54
7. Anhang	60
8. Danksagung	74
Lebenslauf	75

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Postmortale, zeitabhängige Prozesse

Der Begriff „Leichenliegezeit“ (LL) ist in den gängigen Lexika der Medizin nicht definiert (Duden 1992; Pschyrembel 1998; Reallexikon der Medizin 1971; Roche Lexikon Medizin 1993). Nach Henßge und Mitarb. (1988) sowie Henßge (2002) ist unter „Leichenliegezeitbestimmung“ bzw. „Todeszeitbestimmung“ „die Eingrenzung eines Zeitraums durch Untersuchungen an der Leiche, innerhalb dessen der Tod eingetreten ist“, zu verstehen; „sie ist ein Teil der zeitlichen Rekonstruktion von tödlichen Geschehnisabläufen durch rechtsmedizinische Untersuchungen“. In der englischsprachigen Literatur werden für LL häufig die Begriffe „post mortem interval (PMI)“ oder „time since death“ verwendet (Dau 2001; Niess u. Mitarb. 2001; Wehner u. Mitarb. 2000).

Die Eingrenzung der LL ist die Voraussetzung für eine objektive Todeszeit-schätzung und daher eine wichtige Aufgabe im Rahmen der ärztlichen Leichen-schau, z.B. im Hinblick auf erbrechtliche Konsequenzen und Unterhaltsansprüche (Madea und Mitarb. 2003). Aufgrund der hohen Variabilität, mit welcher postmortale Prozesse ablaufen, ist die Suche nach validen Parametern zur Be-stimmung des Postmortemintervalls eine stete Herausforderung an die Gericht-liche Medizin: Daten zur Vorgeschichte über Todeszeit, Todesart und Todesort können völlig fehlen, lückenhaft oder unbewusst und schließlich auch vorsätz-lich verfälscht sein. Zudem sind postmortale Erscheinungen von zahlreichen Faktoren, insbesondere von Temperatur, Feuchtigkeit, Belüftung, Alter, Ernäh-rungs- und Gesundheitszustand sowie Keimbesiedlung abhängig (Dix u. Mitarb. 2000; Forster u. Mitarb. 1986; Henßge 2002; Jachau u. Mitarb. 2002; Madea u. Mitarb. 2003; Penning 1996; Schwerd 1986). Tritt der Tod nicht unter ärztlicher Überwachung ein oder ist der Todeseintritt nicht durch zuverlässige Zeugen belegt, so muss sich die Todeszeitbestimmung nahezu ausschließlich am Aus-bildungsgrad der im folgenden zusammengefassten, zeitlich aufeinander fol-genden Leichenerscheinungen orientieren (Madea und Mitarb. 2003):

Frühe Leichenerscheinungen sind die düster graurot-violett imponierenden **Livores** (Totenflecke), die sich bereits 20-30 Minuten nach dem Kreislaufstillstand abzeichnen können, nach etwa einer Stunde kräftig in Erscheinung treten und bis zu 12 Stunden wegdrückbar sind. Diese Breite der Zeitgrenzen, innerhalb deren die einzelnen Ausbildungsgrade angetroffen oder nicht mehr angetroffen werden können, sind zum großen Teil auf die fehlende Temperatur-Normierung zurückzuführen (Fechner u. Mitarb. 1984; Henßge 2002).

Zu den frühen Leichenerscheinungen zählt auch die Totenstarre, **Rigor mortis**. Sie beginnt ca. zwei Stunden nach Eintritt des Todes am Kiefergelenk und ist nach ca. sechs bis zwölf Stunden vollständig ausgeprägt. Die Totenstarre korreliert mit dem Abbau der energiereichen Phosphate (Kreatinphosphat, ATP, ADP), der glykolytischen Bildung von Milchsäure aus Glykogen und einem entsprechenden pH-Abfall (Forster u. Mitarb. 1986; Belitz u. Mitarb. 1987). Innerhalb der ersten acht Stunden kann der Rigor gebrochen werden und bildet sich dann erneut aus, möglicherweise aufgrund einer ATP-Resynthese durch Glykolyse. Die Lösung der Totenstarre beginnt nach 48 bis 60 Stunden als Folge der Denaturierung von sarkoplasmatischen und myofibrillären Proteinen (Henßge und Mitab. 1988).

Die Feststellung von Totenflecken und Totenstarre an der vollständig entkleideten Leiche im Rahmen der Leichenschau kann von jedem Arzt durchgeführt werden; eine exakte Zeitschätzung aus der Prüfung supravitaler Reaktionen und aus dem Abfall der Körperkerntemperatur setzt fachärztlich-rechtsmedizinisches Instrumentarium und Wissen voraus (Madea und Mitab. 2003).

Die **Körperkerntemperatur** wird 8 cm oberhalb des Sphinkter ani gemessen (Madea und Mitab. 2003). Der Temperaturabfall kann in den ersten acht bis zwölf Stunden wertvolle Daten zur Todeszeitbestimmung liefern. Da der Wärmeausgleich mit der Umgebungstemperatur u.a. von Klima, Bedeckung, Dicke des Unterhautfettgewebes und der Körperoberfläche abhängig ist, wurden No-

mogramme erarbeitet, die diese Variablen zusätzlich zur gemessenen Körpertemperatur berücksichtigen (Henßge u. Mitarb. 1982; Forster u. Mitarb. 1986; Henßge 2002). Die Rektaltemperatur-Todeszeit-Nomogramm-Methode ist die am differenziertesten ausgearbeitete und auch in Feldstudien evaluierte Temperaturmethode (Henßge 2002).

Als **supravitale Reaktionen** werden Vorgänge bezeichnet, die sich nach dem eingetretenen Individualtod in einzelnen Organen oder Systemen im Sinne einer „Überlebensreaktion“ abspielen (Janssen 1977). Die mechanische Muskel-erregbarkeit in Form des Zsako-Sehnen-oder Muskelphänomens, d.h. eine fortgeleitete Erregung über den ganzen Muskel nach adäquater mechanischer Reizung (Zsako 1916), findet sich nur sehr kurze Zeit nach Todeseintritt und kommt daher nur sehr selten am Leichenfundort in Betracht (Henßge 2002). Lokale Muskelkontraktionen auf kräftiges Anschlagen lassen sich als so genannter idiomuskulärer Wulst bis zu 13 Stunden nach dem Tod nachweisen (Henßge u. Mitarb. 1988). In den ersten Stunden post mortem kann sich der idiomuskuläre Wulst schnell zurückbilden, in späteren Phasen kann er aber über Stunden bestehen bleiben (Henßge 2002). Die elektrische Erregbarkeit der mimischen Muskulatur erfordert eine standardisierte elektrische Reiztechnik, d.h. einen relativ hohen Aufwand (Henßge 2002). Die Prüfung auf pharmakologische Erregbarkeit der Iris (Klein u. Mitab. 1978) erfolgt durch subkonjunktivale Injektion von Pupillomotorika wie Atropin, Tropicamid oder Acetylcholin; sie ist 10 bis 46 Stunden post mortem auslösbar, erfordert aber viel Erfahrung, da z.B. die Injektion in die Augenvorderkammer zu paradoxen Reaktionen führen kann (Henßge 2002).

Hunger u. Mitarb. (1993) haben die nachfolgend wiedergegebene Synopsis zur Todeszeitschätzung vorgeschlagen; hieraus leitet sich die Empfehlung ab, im Einzelfall mehrere Methoden/Kriterien einzusetzen, um sowohl die Präzision als auch die Zuverlässigkeit zu erhöhen. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Entwicklung zusätzlicher Verfahren wünschenswert ist.

Tab. 1:

Synopsis der Todeszeitschätzung nach Hunger u. Mitarb. 1993

h pm	0,5	1	2	3	5	6	8	10	12	24	48
Idiomuskulärer Wulst mit Armbeugung sichtbarer Wulst tastbarer Wulst	+++	+++	+++	++> +++	++ +++	+> +++	+>	(+)			
Pupillenreaktion Konjunktiven Injektion Doppelreaktion	+++	+++	+++	++> +++	(+) +++	+++	+++ +++	++ +++>	+> (+)		
Totenflecke Hals u. Nacken fleckförmig konfluierend abbläbbar umlagerbar, vollst. teilw.	<+	++ <+++	+++ +++ <+++	+++	+++ +++	+++ ++> +++	+++ +++	+++ ++	+++> >	(+>)	
Abkühlung, fühlbare Akren unbedeckte Stellen bedeckte Stellen		<+	++ <+	+++ ++	+++	+++ <+	++	+++	+++		
Totenstarre Kleine Gelenke Kiefermuskulatur volle Ausbildung Wiederausbildung nach Lösung Lösungsbeginn			<+	++ <+	+++ +++	+++ <+++ +++	+++ ++	+++ +>		(+)	<+++

Als *späte Leichenveränderungen* werden im Allgemeinen Autolyse, Fäulnis und Verwesung zusammengefasst, Prozesse, die unter dem Sammelbegriff „Thanatochemie“ subsumiert werden können (Lohs u. Mitarb. 1999; Jachau u. Mitarb. 2002). Unter **Autolyse** versteht man den Zerfall von Gewebe als Folge durch körpereigene Enzyme katalysierter Reaktionen: Gewebsstrukturen lösen sich auf – z.B. findet sich häufig ein „autolytisch erweichtes Nebennierenmark“. Enzymreiche Parenchyme mit wenig Bindegewebe wie außer dem Nebennierenmark auch Pankreas, Milz und bei Kindern der Thymus zeigen makroskopisch die frühesten auffälligen Gewebserweichungen und Strukturauflösungen. Histologisch stehen Karyolyse, Karyorrhesis, Kernwandhyperchromasie, Pyknose und „kadaveröse Trübung“ des Plasmas im Vordergrund (Jachau u. Mitarb. 2002).

Mit Hilfe biochemischer Verfahren lassen sich die bei der Leichenzersetzung proteolytischen Veränderungen in unterschiedlichsten Geweben (u.a. Skelett-

und Herzmuskel, Leber-, Nieren- und Milzproben) als Proteinogramme darstellen und als zeitabhängige Kriterien verwenden (Mittmeyer 1978).

Moderne Verfahren benutzen magnetresonanzspektroskopische Methoden zur Bestimmung postmortaler Stoffumwandlungsprozesse z.B. in Hirngewebe (Ith u. Mitab. 2001 u.2002) oder systematische toxikologische Analysen von Markersubstanzen (Schellhorn u. Mitab. 2002). Wehner und Mitarbeiter (1999-2002) haben die LL bis zu drei Wochen mit der Anfärbarkeit zahlreicher biochemischer Substrate in Beziehung gesetzt und typische Zeitverläufe für den Verlust der histochemischen Anfärbarkeit von Thyreoglobulin, Glucagon, Insulin, Calcitonin und Alpha-1-Antitrypsin beschrieben.

Fäulnis wird sowohl durch Eigen- als auch durch Fremdkeime verursacht, wobei Anaerobier überwiegen, welche Substrate reduktiv unter Gasbildung abbauen. Fäulnisbakterien finden dabei zunehmend optimale Wachstumsbedingungen; andere Spezies werden zurückgedrängt, auch krankheitsverursachende Keime, die evolutionär an den lebenden Makroorganismus angepasst wurden wie Hepatitis-, HIV- oder Grippeviren (Jachau u. Mitarb. 2002).

Verwesung tritt auf, wenn Flüssigkeiten abgesintert werden: es handelt sich um mehr trockene, oxidative Prozesse, die zu zundrigem Zerfall der Organe führen. Diese Reaktionen lassen sich auch als aerobe, bakterielle Leichenzersetzung mit stechend-muffigem Geruch umschreiben (Jachau u. Mitarb. 2002).

Für Autolyse, Fäulnis und Verwesung gilt die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (Van't Hoff'sche RGT-Regel): bei Raumtemperatur sind diese Reaktionen nach etwa drei bis vier Wochen abgeschlossen. Auch das umgebende Milieu ist von großem Einfluss. Die Casper-Regel besagt, dass der Aufenthalt in einer Woche Luft etwa zwei Wochen Wasser oder acht Wochen Erdgrab entspricht.

Eine Altersbestimmung der sich an einer Leiche entwickelnden nekrophagen Insektenlarven kann in den ersten Wochen nach Todeseintritt noch eine auf den

Tag genaue Berechnung der Mindestliegezeit der Leiche ermöglichen, die Analyse des Artenspektrums an der Leiche auch länger zurückliegende Zeiträume eingrenzen (Amendt u. Mitarb. 2003)

Zielsetzung der **forensischen Entomologie** ist also die Bestimmung der LL anhand leichenbesiedelnder Gliedertierarten: Leichen, die im Freien liegen, werden sukzessiv von bestimmten Anthropodenarten besiedelt. Die Zusammensetzung dieser Insektengruppen, sowie deren Alter und Größe sind typisch für ein bestimmtes Stadium des Zerfalls der Leiche, da jede dieser Tierarten die Leiche zu ganz bestimmten Zeiten als Nahrungsquelle, Brutstätte und Lebensraum nutzen und diese danach verlassen (Dau 2001; Reichel 2000). Die Schmeißfliegen (Calliphorida) erscheinen bereits wenige Minuten oder Stunden nach Todeseintritt – sie können eine Leiche über Hunderte von Metern riechen – und legen ihre Eier vornehmlich in Körperöffnungen ab. In weiteren Stadien schlüpfen die Larven, dann treten weiße Maden auf, die wiederum anderen Arten als Nahrungsquelle dienen oder abwandern. Bemerkenswert ist, dass derartige Insekten nicht nur in warmen, sondern nekrophile Arten sich auch bei Temperaturen bis zwei Grad Celsius entwickeln und fortpflanzen können (Niess u. Mitarb. 2001). Zahlreiche Anwendungsbeispiele im Rahmen gerichtsmedizinischer und kriminalistischer Untersuchungen finden sich u.a. bei Benecke (1996 a und b, 1998, 2001).

Sehr späte Leichenveränderungen sind völlige **Skelettierung**, die z.B. im Erdgrab nach etwa drei bis vier Jahren abgeschlossen ist. **Knochenentfettung** und Austrocknung erfolgen nach über 10 Jahren. - Bei trockener Wärme und Luftentzug kann es unter weitgehender Erhaltung der Strukturen zur **Mumifizierung** von Leichen kommen. - Weichteile von Leichen, die sich in feuchtem, alkalischem Milieu befinden können sich unter Umständen in Fettwachs (Adipocire) umwandeln, ein Prozess, der Monate bis Jahre dauert. - Seltene **konservierende Leichenerscheinungen** sind Moorleichen, Salzleichen, Permafrostleichen und die Faulleichenkonservierung (Jachau u. Mitarb. 2002).

Durch Bestimmung der Radioaktivität im Knochen ist die Einschätzung auch sehr langer Liegezeiten möglich; das Alter des „Ötzi“ aus Tirol wurde mit Hilfe der C-14-Methode (Radiokarbonmethode) auf 5400 bis 5100 Jahre geschätzt (ETH Zürich 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in Fortsetzung der Studien von Wehner u. Mitarb. (1999-2002) untersucht werden, inwieweit eine Eingrenzung der LL mittels immunhistochemischem Nachweis biochemischer Parameter möglich ist. Als Substrat wurde Cystatin C in der Nebenniere gewählt, ein Inhibitor proteolytischer Enzyme, der bei autolytischen Prozessen eine Rolle spielen könnte.

1.2 Cystatin C

Cystatin C gehört in die große Gruppe der Cystatine; es handelt sich um niedermolekulare Proteine, welche die - früher als „Thiolproteasen“ bezeichneten - Cysteinproteasen, z.B. Papain, zu hemmen vermögen (Stryer 1988; Otto u. Mitarb. 1997). Mit „Cystatin“ wurde ursprünglich eine aus Hühnereiweiß isolierte Fraktion bezeichnet, die die Aktivität von Papain hemmte (Fossum u. Mitarb. 1968; Barrett 1981): also ein **Cysteinprotease- Inhibitor**; der Mittelteil des Begriffes „**stat**“ ist aus dem Griechischen „stasis = Stillstand“ bzw. dem Lateinischen „stagnare = stehen machen“ abgeleitet (Grubb 2001). Erste Beobachtungen über den Cysteinprotease-Hemmer wurden bereits im Jahr 1961 publiziert; ältere Bezeichnungen für Cystatin C sind: „Gamma-Trace“, „Post-Gamma-Globulin“, „Gamma-CSF“, „Gamma-c- Globulin“ und „High Alkaline Fraction (HAF)“ (Grubb 2001).

Die meisten Gewebe können Cystatin C, allerdings in sehr unterschiedlichen Mengen produzieren, das in den Extrazellularraum sezerniert wird (Reed 2000). Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden ist es in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden, z. B. in kortikalen Neuronen, in Inselzellen des Pankreas, in der Thyreoida und in den Speicheldrüsen (Otto u. Mitarb. 1997). In endokrinen Zellen des Nebennierenmarks von Affe und Hund sowie in menschli-

chem Phaeochromocytom-Gewebe wurde „Gamma-Trace“, von Löffberg u. Mitarb. im Jahr 1982 ebenfalls immunhistochemisch erstmals nachgewiesen. Es fand sich im Cytoplasma, und zwar „in Form von Spiralen und Streifen“. Nachuntersuchungen dieser Befunde sind nicht bekannt (Grubb, persönl. email-Mitt.vom 18. 03. 2002). Die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Verteilung von Cystatin C in der Nebenniere kann noch nicht endgültig beantwortet werden. Hinweise ergeben sich aus der Literatur: Es ist bekannt, dass die Zellen des Nebennierenmarks zusätzlich zu den Katecholaminen eine Reihe biologisch aktiver Peptide produzieren und sezernieren (Löffberg u. Mitarb. 1982). Kitamura u. Mitarb. (2001) sowie Kobayashi u. Mitarb. (2001) haben die Peptide Adrenomedullin und Proadrenomedullin in hoher Konzentration nachgewiesen; interessanterweise enthält Adrenomedullin eine Disulfidbrücke, also einen hypothetischen Angriffspunkt für einen Cysteinproteaseninhibitor (Kitamura u. Mitarb. 2001). Weitere Peptide sind Secretogranin II und die Chromogranine A und B (Park u. Mitarb. 2002). Die Arbeitsgruppe von Prof. Amselgruber (Univ. Hohenheim) erbrachte den immunhistochemischen Nachweis von Chromogranin A in der Nebenniere des Schweins (Uecker 1999; Uecker u. Mitarb. 1999). Somit liegt es nahe, aufgrund der topographischen Verwandtschaft eine funktionelle Beziehung zwischen Cystatin C und den erwähnten Peptiden zu diskutieren.

Cystatin C findet sich in allen Körperflüssigkeiten. Die Halbwertszeit im Rattenplasma liegt bei 20 Minuten. Bei gesunden Erwachsenen wurden folgende Konzentrationen gemessen (nach Grubb 2001; angegeben sind das arithmetische Mittel sowie Minima und Maxima):

Blutplasma	0,96	(0,57 - 1,79)	mg/L
Liquor cerebrospinalis	5,80	(3,20 - 12,5)	mg/L
Speichel	1,80	(0,36 - 4,8)	mg/L
Tränenflüssigkeit	2,40	(1,30 - 7,40)	mg/L
Ejakulat-Plasma	51	(41,2 - 61,8)	mg/L
Muttermilch	3,40	(2,20 - 3,90)	mg/L

Urin 0,095 (0,033 -0,29) mg/L

Aus dem Blutplasma wird Cystatin C durch glomeruläre Filtration geklärt; die renale Clearance beträgt etwa 94%. Zu rund 99% wird anschließend das filtrierte Cystatin C in den Tubuluszellen degradiert. Da außer bei Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei keiner anderen Erkrankung deutlich erhöhte Plasma-Cystatin C-Spiegel gemessen wurden, ist Cystatin C wahrscheinlich ein idealer Marker zur Bestimmung der GFR (Page u. Mitarb. 2000; Dworkin 2001; Galteau u. Mitarb. 2001). Automatisierte Bestimmungsmethoden für Plasma-Cystatin C sind im Handel erhältlich, sodass dieser Parameter das Serum-Kreatinin als „Goldstandard“ für die Beurteilung der Nierenfunktion weitgehend abgelöst hat.

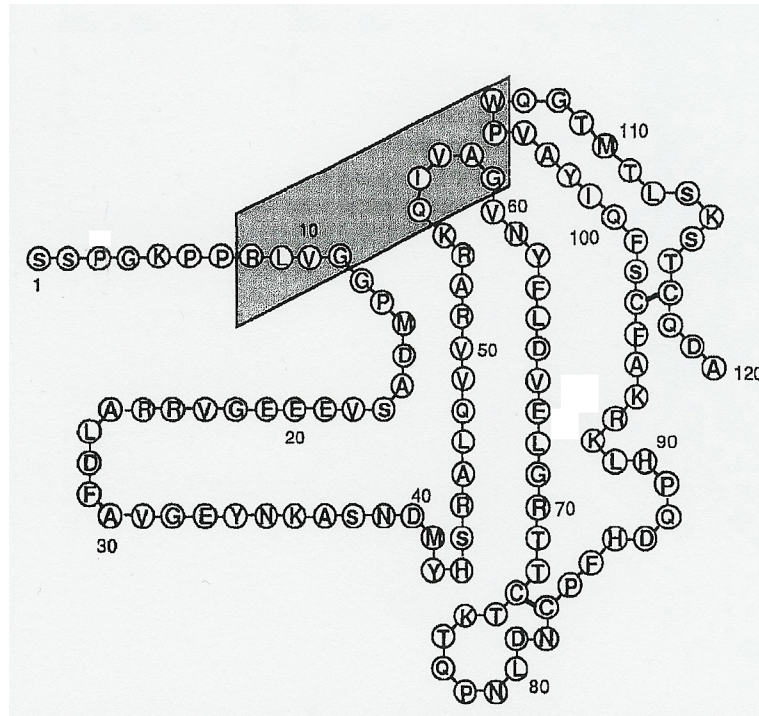
Die Cystatine werden in drei große Familien unterteilt (Grubb 2001):

- a. Die intrazellulären Cystatine: Cystatin A (Stefin A), Cystatin B (Stefin B),
- b. Die intravaskulären Cystatine: LMV-Kininogen, HMW-Kininogen,
- c. Die extrazellulären (transzellulären) Cystatine: **Cystatin C**, Cystatin D, Cystatin E, Cystatin F, Cystatin S, Cystatin SA, Cystatin SN.

Die Cystatine setzen sich aus 110-120 Aminosäuren zusammen, besitzen Molekulargewichte von 12 bis 13,3 kDa und zeichnen sich durch ihre große Stabilität gegenüber hohen Temperaturen (bis zu 100° C) und gegenüber pH-Änderungen (pH 2 bis pH 12) aus (Otto u. Mitarb. 1997).

Grubb und Löfberg publizierten im Jahr 1982 die Aminosäuresequenz von Cystatin C; die Sequenz der 120 Aminosäuren ist dieser Arbeit entnommen:

Abb. 1:



Aminosäuresequenz von Cystatin C nach Grubb u. Mitarb. 1982. Die schraffierten Abschnitte markieren den inhibitorischen Anteil für Papain-ähnliche Cysteinproteasen. Das Molekulargewicht beträgt 13,3 kDa.

Die Gene für die Cystatinfamilie sind auf Chromosom 20 lokalisiert (Calkins u. Mitarb. 1995). Eine Punktmutation des Cystatin C-Gens soll verantwortlich für eine autosomal dominant vererbte, in Island beschriebene Erkrankung sein, der hereditären Cystatin-C-Amyloid-Angiopathie (Henskens u. Mitarb. 1996). Ein Polymorphismus des Cystatin C-Gens und Ablagerungen von Cystatin C im Gehirn werden auch im Zusammenhang mit spät auftretenden Formen der Alzheimer'schen Erkrankung diskutiert (Maruyama u. Mitarb. 1990; Bernstein u. Mitarb. 1996; Crawford u. Mitarb. 2000; Deng u. Mitarb. 2001; Levy u. Mitarb. 2001).

Da Cystatin C als Enzyminhibitor eine Schlüsselrolle bei autolytischen postmortalen Prozessen spielen dürfte, erschien es lohnend, diesen Parameter in Fortsetzung der Arbeiten von Wehner u. Mitarb. (1999-2002) parallel zu herkömmli-

chen histologischen Zellveränderungen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden zu studieren.

Das Wesen der Immunhistochemie besteht darin, dass sie die spezifische Darstellung antigener Substanzen aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion im Schnittpräparat ermöglicht. Dies bedeutet, dass das im Gewebepräparat vermutete Antigen, gegen welches sich der spezifische Antikörper richtet, in diesem Präparat auch vorhanden ist. Dabei binden polyklonale Antikörper an verschiedene Epitope des Antigens, während monoklonale Antikörper monospezifisch nur eine einzige Epitop-Klasse eines Antigens erfassen. Die Antigen-Antikörper-Präzipitate können in einem zweiten Schritt durch spezielle, für den Antikörper spezifische, Enzym-markierte Detektionssysteme sichtbar gemacht werden. Das Enzym, welches an der Stelle des gesuchten Antigens angereichert vorliegt, ermöglicht in einem weiteren Schritt die färberische Lokalisierung des Antigens, da zugegebenes Substrat durch die Enzymaktivität umgesetzt und als Farbstoff niedergeschlagen wird, womit der Antigen-Nachweis gelingt. Wesentlich ist, dass die heute verfügbaren hochaffinen Primärantikörper (poly- oder monoklonal) sowie die sehr sensitiven Detektionssysteme es ermöglichen, relativ geringe Antigen-Mengen nachzuweisen, sodass vielfach an üblichen Paraffinschnitten formalinfixierten Gewebes gearbeitet werden kann. Ein weiterer Vorteil der Immunhistochemie ist, dass man dauerhafte Präparate erhält, die im üblichen Durchlichtmikroskop betrachtet und beurteilt werden können.

1.3 Untersuchungsziel

In Untersuchungsmaterial aus den Asservaten des Instituts für Gerichtliche Medizin sowie an Kadavern von Labormäusen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- a** Wie lange nach Eintritt des Todes ist Cystatin C im Nebenniermark anfärbbar?
- b** Müssen zusätzliche Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit berücksichtigt werden?
- c** Ist die (Nicht-) Anfärbbarkeit von Cystatin C ein valider Parameter zur Eingrenzung der LL?

2 Material und Methodik

Die Betreuung der Arbeit durch Herrn Professor Dr. med. Dr. Dipl-Phys. H.D. Wehner und die Annahme des Themas der Arbeit durch die Medizinische Fakultät der Eberhard Karls-Universität wurde mit Datum vom 18. 07. 2002. bestätigt. Die Ethik-Kommission der Fakultät, die seit 01.01.2001 von Anmeldungen in Kenntnis gesetzt werden muss, hatte keine Einwände.

2.1 Material aus den Asservaten des Instituts

Insgesamt 444 Nebennieren-Gewebe-Proben wurden aus den Asservaten des Instituts für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen entnommen: zunächst wurden 250 Organe aufgearbeitet; nach der biometrischen Beratung (siehe Punkt 2.4) wurden weitere 194 Präparate aus noch älteren Asservaten angefertigt, da die Lagerung in Formalinlösung keinen erkennbaren Einfluss auf die Anfärbbarkeit von Cystatin C hatte. Relevante anamnestische Daten wurden aus den entsprechenden Sektionsprotokollen für den Zeitraum Januar 1995 bis Januar 2002 entnommen (siehe Anhang). Kriterien für die Probenauswahl waren eine kriminalpolizeiliche Eingrenzung der Leichenliegezeit auf +/- 1Tag sowie eine Heterogenität bezüglich des Liegemilieus, der Leichenkonstitution und der Todesursachen. Die Liegezeit betrug zwischen 1 und 22 Tagen, die äußeren Bedingungen wie Liegeort, Bedeckung/Bekleidung und Jahreszeit waren von Fall zu Fall unterschiedlich. Es wurden nur Leichen in die Untersuchung einbezogen, bei denen prä mortal keine Nebennierenerkrankung wie Nebennierenapoplexie oder –insuffizienz diagnostiziert wurde. In etwa 2% der Asservate waren keine Nebennieren vorhanden („starke Fäulnis“, „Autolyse“, „Explantation der Nieren“ oder keine Angaben von Gründen). Die Gewebe waren in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung konserviert; überwiegend war nur eine Nebenniere asserviert. Waren mehrere Organteile vorhanden, wurde nur eine durch das Los ermittelte Probe entnommen und aufgearbeitet. – Von jedem Organ wurde eine circa 3 mm x 10 mm x 10 mm messende Scheibe herausgeschnitten, wobei streng darauf geachtet wurde, dass das dunkelbräunlich imponie-

rende Mark erfasst wurde. Proben, welche diese Kriterien nicht erfüllten, wurden verworfen.

2.2 Tierkadaver

Die Studien an Tierkadavern sollten zum Nachweis der Anfärbarkeit von Cystatin C in der Nebenniere unter definierten Bedingungen wie Liegezeiten und äußeren Bedingungen dienen. Die Experimente waren nicht genehmigungspflichtig, da eine „Organentnahme ohne Versuch in Narkose“ (CO₂ mit anschließender Abtötung) erfolgte (Tierschutzgesetz i.d.F. vom 25.05.98, § 6, Abs. 1, No.4). Insgesamt 33 adulte, weibliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 33-38 g wurden von der Zentralen Versuchstiersversorgung der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um einen häufig benutzten Albino-Mäusestamm, der aus dem **Naval Medical Research Institute** nach Europa gebracht wurde und auf SWISS-Mäuse zurückgeht (Güttner u. Mitarb. 1993). – Es wurden drei identische Versuchsreihen in den Zeiträumen 18. 03. 02. bis 28. 03. 02. bzw. 21. 05. 02. bis 31. 05. 02. bzw. 01. 10. 02 bis 11. 10. 02. durchgeführt. Zu Versuchsbeginn wurde jeweils ein Kontrollkadaver autopsiert (Zeitpunkt: 0 Tage). Anschließend wurden die Tierkadaver entweder im Institut oder im Freien gelagert und je eine Maus an Tag 2; 4; 6; 8 und 10 obduziert. Die Zimmertemperatur betrug im Durchschnitt 18 - 20 ° C. In der ersten Versuchsreihe betrug die Außentemperatur tagsüber 10-18° C; es herrschte feuchtwarmes Frühlingwetter. In der zweiten Versuchsreihe betrug die Außentemperatur tagsüber bis zu 29 ° C; es herrschte schwülwarmes Wetter. In der letzten Serie betrug die Außentemperatur tagsüber 15-20 °C; es herrschte feuchtwarmes Herbstwetter. – Von jeder Maus sollten beide Nebennieren entnommen und – analog den Humanproben – in gepufferter 4%iger Formaldehydlösung bis zur histochemischen Aufarbeitung konserviert werden.

2.3 Histologische und immunhistochemische Methoden

2.3.1 Histologie

Die Herstellung histologischer Schnittpräparate erfolgte nach Standard-Labor-Methode: Die zugeschnittenen Organpräparate wurden in Plastik-Einbett-Kassetten überführt, während 4 Stunden in kaltem Leitungswasser gewässert und über Nacht in einem automatisierten Gewebe-Einbeter (Citadel 1000^R, Fa Shandon) zunächst mit einer ansteigenden Alkoholreihe (70 bis 99,9 Vol% Ethanol, Isopropanol, Xylol), dann mit erwärmtem Paraffin (Sherwood -Medical^R-Komplex aus gereinigtem Paraffin und Kunststoffpolymeren mit Zusatz von Dimethylsulfoxid) zur Schnellinfiltration des Gewebes behandelt. Nach fünfminütigem Abtropfen wurden die Kassetten geöffnet und die Organe in Gussformen mit erwärmtem (60 °C), verflüssigtem Paraffin (Fa Jung: Histotap^R) überführt. Nach 10minütigem Abkühlen auf einer Gefrierplatte (Fa Shandon) wurden die Paraffinblöcke aus der Gussform herausgelöst, die Ränder zugeschnitten und in ein Mikrotom (Microm HM 330, Heidelberg) eingespannt. Pro Organpräparat wurden zwei, etwa drei Mikrometer dicke Schnitte angefertigt, kurz in ein erwärmtes Wasserbad (Raumtemperatur) gegeben und luftblasen- und faltenfrei auf Objektträger aufgezogen. – Nach 24stündigem Antrocknen bei Raumtemperatur folgte die immunhistochemische Darstellung von Cystatin C gemäß Färbvorschrift.

2.3.2 Immunhistochemie

Prinzip: Nach Mikrowellenvorbehandlung der Gewebeschnitte zur Antigen-Demaskierung wurde zum Nachweis von Cystatin C ein polyklonaler Anti-Cystatin C-Antikörper vom Kaninchen als Primärantikörper verwendet; als Sekundärantikörper diente biotinyliertes Anti-Kaninchen-F(ab)₂-Fragment. Der Nachweis der spezifischen Antigenbindung erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

A Entparaffinierung

- Einbringen der Schnitte in Xylolersatzlösung (Rothiclear^R) für 30 min.
- Absteigende Ethanolreihe: 99,9%ige, 96%ige, 80%ige, 70%ige wässrige Ethanollösung für je 5 min.
- Destilliertes Wasser für 5 min.
- Umrahmung des Schnittes mit Dako-Pen^R.

B Antigen-Demaskierung

- Einbringen der Schnitte in 200 mL Mikrowellenpuffer (Fa. Dako); Mikrowellenbehandlung mit 800W für 2 x 5 min.
- Abkühlphase für 20 min.
- Spülen in destilliertem Wasser für 5 min.

C Peroxidase-Blockierung

- Inkubation der Schnitte in 3%iger, wässriger Wasserstoffperoxid-Lösung für 20 min.
- Spülen mit TBS-Puffer für 2 x 3 min.

D Cystatin C – Detektion

- Inkubation der Schnitte in Schweineserum (1:19 verdünnt mit Tris-Puffer) für 30 min. bei Raumtemperatur (RT).
- Inkubation mit polyklonalem Anti-Cystatin C-Antikörper vom Kaninchen der Fa. Dako (Verdünnung 1:400) als Primärantikörper für 30 min. bei RT.
- Spülen mit TBS-Puffer für 2 x 3 min.
- Inkubation mit Schwein-Antikaninchen-Immunglobulin der Fa. Dako (Verdünnung 1:200) als Sekundärantikörper für 30 min. bei RT.
- Spülen mit TBS-Puffer für 2 x 3 min.
- Inkubation in PAP-Reagenz (Peroxidase Antiperoxidase) Anti-

- Kaninchen der Fa. Dako (Verdünnung 1:100) für 30 min. bei RT
- Spülen mit TBS-Puffer für 2 x 3 min.
 - Inkubation mit gepufferter Diaminobenzidin (DAB) - Chromogenlösung für 5 min. bei RT
 - Spülen mit destilliertem Wasser für 5 min.
 - Gegenfärbung durch Inkubation in wässriger Häkalaun-Lösung für 2 min.
 - Bläuen unter fließendem Wasser für 10 min.

E Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine (36 °C).

2.3.3 Reagenzien

Die nachfolgend aufgeführten Reagenzien für die Immunhistochemie wurden von der Firma DAKO A/S, DK-2600 Glostrup bezogen und gemäß Vorschrift eingesetzt:

- Buffer for Antigen Retrieval, Code No. S 2031 (= Citrat-Puffer, pH 6,0)
- Prediluted Primary Antibodies Peroxidase/Kaninchen PAP, Code No. Z 0113, Lot 038
- Swine Serum, Code No. X 0901, Lot 110
- Cystatin C, Polyklonal Kaninchen Anti-Human. Code No. A 0451, Lot 028
- Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline. Code No. Z 0196, Lot 043
- Liquid DAB Large Volume Substrate-Chromogen System, Code No. K 3466

Die eingesetzten **Puffer** wurden nach folgender Rezeptur hergestellt:

- Trispuffer: 6,1g Tris, 37 mL 1n-HCl in 1 L Aqua dest.; pH 7,6 (0,05 molar)
- TBS-Puffer: 1 L 0,05 molarer Tris-Puffer plus 9 L 0,85%ge NaCl-Lösung

Für saures **Häkalaun** (nach Mayer) wurde folgende Rezeptur verwendet:

1g Hämatoxylin in 1 L Aqua dest. + 0,2g NaJO₃ + 50g Kaliumaluminiumsulfat (=Kalialaun). Nach Durchschütteln Zugabe von 50g Chloralhydrat + 1g Citronensäure. Die fertige Lösung ist rötlich-violett und in dunkler Flasche über Wochen haltbar.

2.4 Versuchsplanung und Auswertung

Endpunkte: Nach Wink (2002) muss vor Beginn einer Studie zwischen primären und sekundären Endpunkten, bzw. Studienzielen unterschieden werden. Primärer Endpunkt der hier geplanten Studie war der immunhistochemische Nachweis von Cystatin C in der Nebenniere sowie der Verlust der spezifischen Anfärbbarkeit in Abhängigkeit von der LL. Hierdurch sollte die Abschätzung eines definierten Intervalls der LL ermöglicht werden. Sekundäre Endpunkte waren morphologische Zellveränderungen, ebenfalls in Abhängigkeit von der LL.

Fallzahlschätzung: Aus vorangegangenen Studien des Arbeitskreises zur selben Fragestellung lagen bereits Ergebnisse über die immunhistochemische Detektion von Thyreoglobulin, Insulin, Glucagon und Calcitonin vor (Wehner u. Mitarb. 1999 - 2002). Aufgrund dieser Daten und den Ergebnissen der ersten 250 Nebennierenproben erschien eine Eingrenzung der LL auf weniger als 13 Tage bei positiver Immunreaktion und auf mehr als 5 Tage bei fehlender Reaktion möglich. Um dieses Zeitfenster statistisch abzusichern, wurde die erforderliche Fallzahl bei einer Sicherheit von über 97,5% auf N=435 geschätzt, unter der Voraussetzung, dass der Cystatin C-Nachweis bis zum Tag 5 durchgehend positiv und ab dem Tag 13 durchgehend negativ ist (R. Schwabe, Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen).

Klassifizierung der LL: Erfahrungsgemäß überwiegen im Untersuchungsgut des Instituts Leichen mit kürzeren gegenüber solchen mit längeren LL. Entsprechend verteilten sich auch die untersuchten Nebennierenproben ungleichmäßig auf die LL. Um eine Aussage darüber zu erhalten, mit welchen LL erfahrungsgemäß zu rechnen ist, wurden die entsprechenden Daten aus den Sektionspro-

tokollen bzw. Akten des Institutes für die Jahrgänge 1995 bis 2002 entnommen und in Tabelle 2 zusammengestellt. Aus diesen Daten konnte nach Festlegung von Schwellenwerten (S) für definierte Zeiten (X, in Tagen) jeweils die Wahrscheinlichkeit für „kurze“ und „lange“ LL abgeschätzt werden, wenn zusätzlich bekannt war, ob die immunhistochemischen bzw. histologischen Merkmale (siehe Endpunkte) negativ waren.

Tab. 2:*Leichenliegezeiten (in Tagen) in den Jahrgängen 1995-2002 des Institutes. k.A.: keine Angaben*

Jahr LL in Tagen	1995		1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002	
	1	232	42%	231	43%	193	43%	220	44%	162	38%	220	48%	236	43%	22
2	138	25%	136	26%	106	24%	103	21%	104	25%	108	24%	130	24%	14	23%
3	46	8%	61	11%	50	11%	56	11%	55	13%	43	9%	52	9%	2	3%
4	39	7%	28	5%	23	5%	25	5%	23	5%	27	6%	31	6%	5	8%
5	25	5%	17	3%	15	3%	11	2%	9	2%	15	3%	13	2%	1	2%
6	9	2%	5	1%	7	2%	9	2%	11	3%	3	1%	10	2%	3	5%
7	9	2%	7	1%	11	2%	7	1%	7	2%	3	1%	9	2%	3	5%
8	5	1%	7	1%	0	0%	6	1%	3	1%	2	0%	2	0%	1	2%
9	3	1%	2	0%	2	0%	1	0%	0	0%	1	0%	5	1%	1	2%
10	1	0%	2	0%	2	0%	2	0%	3	1%	1	0%	4	1%	2	3%
11	2	0%	1	0%	2	0%	9	2%	1	0%	2	0%	4	1%	0	0%
12	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	1	0%	2	0%	1	0%	1	2%
13	1	0%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%	1	0%	3	1%	1	2%
14	1	0%	2	0%	1	0%	1	0%	1	0%	0	0%	0	0%	0	0%
15	0	0%	2	0%	2	0%	1	0%	3	1%	2	0%	1	0%	0	0%
16	0	0%	1	0%	0	0%	2	0%	0	0%	0	0%	3	1%	0	0%
17	0	0%	2	0%	0	0%	2	0%	1	0%	0	0%	0	0%	0	0%
18	1	0%	2	0%	2	0%	0	0%	1	0%	0	0%	0	0%	0	0%
19	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%	1	0%	0	0%	1	0%	0	0%
20	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
21	2	0%	2	0%	4	1%	0	0%	2	0%	2	0%	5	1%	1	2%
> 21	7	1%	8	2%	7	2%	6	1%	5	1%	1	0%	13	2%	1	2%
k.A.	31	6%	16	3%	23	5%	31	6%	29	7%	26	6%	28	5%	2	3%
Gesamt	552	100%	532	100%	451	100%	495	100%	422	100%	459	100%	551	100%	60	100%

Die **Beurteilung der Schnittpräparate** erfolgte unter Blindbedingungen bei lichtmikroskopischer Vergrößerung; beurteilt wurde das Nebennierenmark.

- Die Objektträger trugen die Nummern der entsprechenden Sektionen. Nach abgeschlossener Beurteilung wurden die Präparate dechiffriert, d.h. den entsprechenden Sektionsbefunden zugeordnet. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Microsoft-Excel-Programms tabellarisch zusammengefasst und befinden sich im Anhang. Als qualitative Merkmale dienten:

- Anfärbbarkeit oder fehlende Anfärbbarkeit von Cystatin C (**C+ bzw. C-**)
- Vorhandensein oder Abwesenheit intakter Nuklei (**N+ bzw. N-**)
- Vorhanden oder Fehlen intakter Zellmembranen (**ZM+ bzw. ZM-**)
- Vorhandensein / Fehlen von homogen angef. Cytoplasma (**CP+ bzw. CP-**)

Auswertung: Die erhobenen Daten sind zunächst in Häufigkeitstabellen und Stabdiagrammen dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit einer Abhängigkeit der Merkmale C+, N+, ZM+ und CP+ (y, Ordinate) von der Leichenliegezeit (x, Abszisse) wurde durch logistische Regressionen und relative Häufigkeiten geschätzt und graphisch mit 95%igem Konfidenzband für jeden vorhergesehenen Punkt auf der Regressionskurve dargestellt. Aus dem Befund, dass alle Kurven einen sigmoidal abfallenden Verlauf zeigen folgt, dass die Merkmale zu gewissen Zeitpunkten positiv *oder* negativ sein können. Da die Merkmale, insbesondere C+/C-, quasi als „Laborbefunde“ die „Diagnose“ lange oder kurze Leichenliegezeit unterstützen sollen, musste folglich versucht werden, nicht nur deren Sensitivität und Spezifität, sondern zusätzlich deren Vorhersagewert (prädiktiven Wert) zu beurteilen (Harms 1992; Hilgers u. Mitarb 2002; Thomas 1992). Der Vorhersagewert eines diagnostischen Tests lässt sich aber nur in Verbindung, d.h. in Kenntnis der Prävalenz einer Krankheit, also ihrer relativen Häufigkeit, angeben. Bekannt ist als Beispiel abhängiger Ereignisse die Diagnose „Appendizitis“ in Kombination mit dem Befund „Loslass-Schmerz“ (Harms 1998): Aufgrund ärztlicher Erfahrung ist bekannt, dass etwa 60% der Patienten mit akuten Abdominalbeschwerden eine Appendizitis haben („Prävalenz“). Unter der Bedingung des Nachweises eines kontralateralen Loslass-Schmerzes beträgt die Wahrscheinlichkeit 90% („positiver Vorhersagewert“); fehlt hingegen

dieses Symptom, so beträgt die Wahrscheinlichkeit nur 30% („negativer Vorhersagewert“). Im konkreten Fall wurde von R. Vonthein (Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen) vorgeschlagen, als Prävalenz die relative Häufigkeit „langer“ bzw. „kurzer“ LL aufgrund der bekannten historischen Daten zu betrachten (Tabelle 2), und zwar in Bezug auf Schwellenwerte (S) von 1 bis 21 Tage: Demnach gilt für „lange LL“: ($LL > S$) und für „kurze LL“: ($LL \leq S$). Es interessierte nun, inwieweit die a-priori-Chance¹ für längere Liegezeiten sich unter der Bedingung eines negativen Merkmals (C-, N-, ZM-, CP-) erhöht und unter der Bedingung eines positiven Merkmals (C+, N+, ZM+, CP+) verringert. Die Schätzung dieser bedingten, bzw. a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten¹ erfolgte an Hand positiver und negativer Likelihood Quotienten (LQs), auch Likelihood Ratios (LRs) genannt (Hilgers und Mitarb. 2002). Diese lassen sich auf zwei verschiedene Arten errechnen: Zum einen als Verhältnis zweier Wahrscheinlichkeiten und zum andern als Verhältnis zweier Chancen. Der positive LQ ist definiert als: $LQ+ = \text{Sensitivität} / 1 - \text{Spezifität}$, d.h. z.B. als das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis unter den Erkrankten zur Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis unter den Gesunden. Analog gilt für den negativen LQ: $LQ- = 1 - \text{Sensitivität} / \text{Spezifität}$.

Die Anwendung des Satzes von Bayes liefert einen alternativen Ansatz, bei dem sich durch einige Umformungen ablesen lässt, dass ein positiver LQ den Faktor angibt, um den sich die a-priori-Chance z.B. für eine längere Liegezeit ($LL > S$) nach Vorliegen eines negativen Testergebnisses (C-, N-, CP-, ZM-) erhöht. Das Gegenteil gilt für einen negativen LQ, d.h. für den Fall, dass die

¹ Zwei Ereignisse werden als voneinander abhängig bezeichnet, wenn die Wahrscheinlichkeit (likelihood) für das Auftreten eines Ereignisses vom Auftreten des vorangehenden Ereignisses beeinflusst wird („bedingte Wahrscheinlichkeiten“). Als „a-priori-Chance“ (oder a-priori-Wahrscheinlichkeit, Prätest-Wahrscheinlichkeit oder Prävalenz) wird die Wahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Merkmal in der Grundgesamtheit bezeichnet. Durch einen positiven diagnostischen Test kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses erhöht werden. Da der positive Vorhersagewert die diagnostische Fähigkeit eines positiven Testergebnisses widerspiegelt, wird er auch als „a-posteriori-Chance“ bzw. a-posteriori-Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Merkmals bezeichnet. (Herms 1998, S.60; Hilgers et al. 2002, S.81-84)

Merkmale (noch) nachweisbar sind (siehe Tab. 5). Der Test wird als akzeptabel gewertet, wenn der positive LQ >3 , bzw. der negative LQ $<0,3$ ist und als exzellent, wenn der positive LQ >10 , bzw. der negative LQ $<0,1$ ist (Hilgers u. Mitarb. 2000).

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Cystatin C in der Nebenniere

Im Nebennierenmark von Leichen mit einer LL bis zu zwei Tagen ließ sich in allen Fällen eine positive Immunreaktion gegenüber Cystatin C nachweisen. Abbildung 2 zeigt Schnittpräparate von Fallnummer 406/01 [siehe Anhang]: In Abb. 2a erfolgte Färbung *mit* Cystatin C Antikörper, in Abb. 2b erfolgte Färbung *ohne* Cystatin C Antikörper: Es zeigt sich eine deutlich positive Markierung der Nebennierenmark-Zellen nach Antikörperbehandlung, wobei die Nebennierenrindenzellen im wesentlichen unmarkiert bleiben. Das Nebennierenmark weist also hohe Konzentrationen an Cystatin C auf, wie bereits von Löffberg u. Mitarb. 1982 für humane Phäochromozytomzellen beschrieben. Betont sei, dass Organpräparate der Jahrgänge 1995 bis Februar 2002 bei gleich kurzer LL einheitlich anfärbbar waren, d.h. Cystatin C wird in Formalinlösung über Jahre hinweg konserviert.

Analoge Befunde zeigten sich bei dem Versuch mit Mäusen: Im Nebennierenmark von frisch getöteten Tieren war Cystatin C stets anfärbbar (Abb. 3a), wobei wiederum die Nebennierenrindenzellen im wesentlichen unmarkiert blieben. Nach einer LL im Durchschnitt von sechs Tagen oder länger ließ sich hingegen keine Anfärbbarkeit mehr detektieren (Abb. 3b).

Abb. 2:

Abb. 2a

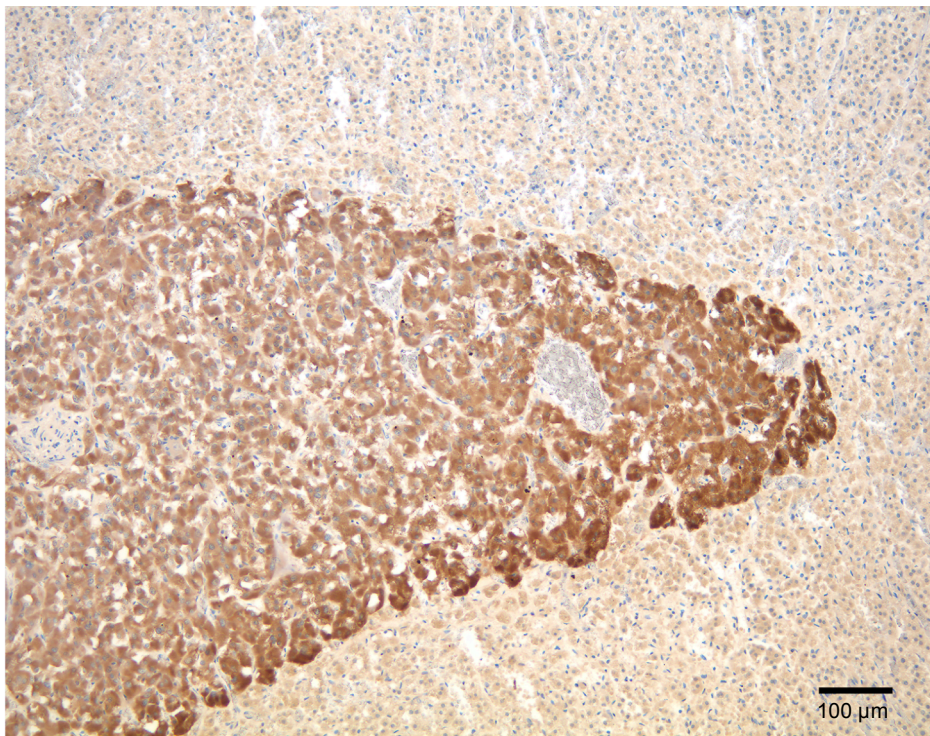
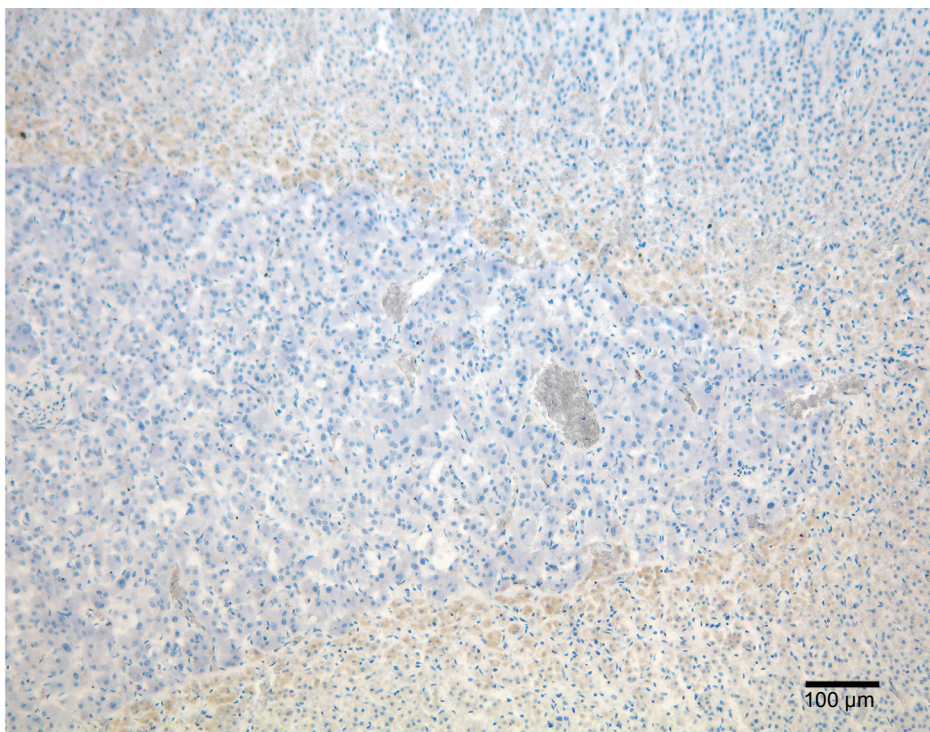


Abb. 2b



*Schnittpräparat einer humanen Nebenniere (LS 406/01):
Abb. 2a mit Cystatin C Antikörper- und Abb. 2b ohne Cystatin C Antikörperfärbung.*

Abb.3:

Abb. 3a

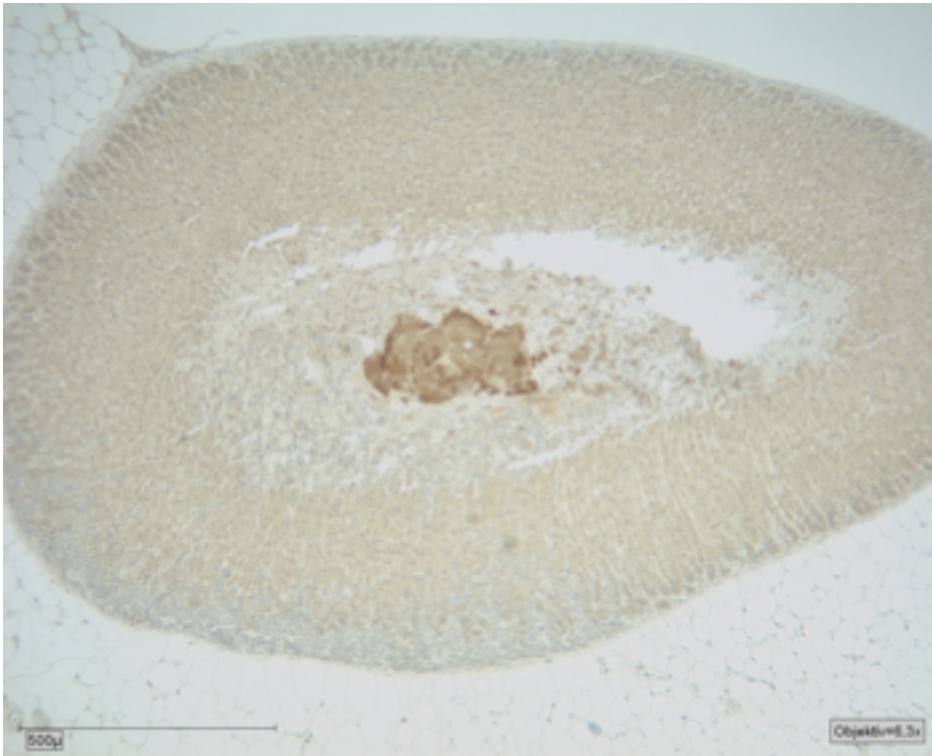


Abb. 3b



Schnittpräparate von Mäuse-Nebennieren mit Cystatin C Antikörperfärbung: Abb. 3a LL zum Zeitpunkt 2 Tage (Cystatin C +) und Abb. 3b zum Zeitpunkt 4 Tage nach Tod (Cystatin C -). Gleiche Vergrößerung wie in Abb. 2.

3.2 Postmortale, zeitabhängige Abnahme der Anfärbarkeit von Cystatin C

3.2.1 Humanorgane

Wie bereits ausgeführt gelangte Nebennierengewebe zur immunhistochemischen Untersuchung, wenn eine kriminalpolizeiliche Eingrenzung der LL auf +/- 1 Tag möglich war. Die LL betrug zwischen 1 Tag und 22 Tagen, die äußeren Bedingungen wie Liegeort, Bedeckung/Bekleidung und Jahreszeit waren von Fall zu Fall unterschiedlich (Details siehe Anhang): Es handelte sich um 302 männliche und 142 weibliche Leichen; das erreichte Lebensalter betrug bei 3% 0 bis 18 Jahre, bei 70% zwischen 19 und 65 und bei 27% mehr als 65 Lebensjahre. Die jüngste Leiche hatte ein Lebensalter von weniger als 1 Woche, die älteste 96 Jahre erreicht.

Von den insgesamt 444 Nebennierenproben mussten bei der Auswertung zwei Fälle herausgenommen werden, da es sich nach erneuter Betrachtung laut Aktenlage um „schwer eingrenzbarere Fälle“ handelt (LS 269/96 und LS 408/01). In einem weiteren Fall ließ sich die LL von 13 auf 11 Tage korrigieren (LS 244/00) und bei einem weiteren Fall zeigte sich im Nachschnitt ein positives Färbeergergebnis (LS 227/99). In die endgültige Auswertung gelangten Daten von 442 Nebennierenproben. Die Fundorte der Leichen waren Haus/Krankenhaus (78,75%), „im Freien“ (11,3%), „im Wasser“ (4,75%) und „im PKW“ (5,2%) (Details siehe Anhang).

In **Tabelle 3** und **Abbildung 4** sind die Häufigkeiten für Cystatin C anfärbbare Nebennieren in Abhängigkeit von der LL wiedergegeben: Es zeigt sich, dass eine zeitabhängige Anfärbarkeit von Cystatin C gegeben ist. So weist das Nebennierenmark von Leichen mit einer LL bis zu 2 Tagen in allen Fällen eine positive Immunreaktion gegenüber Cystatin C auf, was bei einer LL von mehr als 12 Tagen in keinem Fall zu verzeichnen ist. Das Intervall zwischen dem 3. und dem 12. Tag nach Eintritt des Todes stellt sich uneinheitlich bezüglich der Im-

munreaktion dar. Während der immunhistochemische Nachweis von Cystatin C in einigen Fällen gelingt, ist dies bei anderen Fällen aus diesem Zeitraum nicht der Fall. Der Fundort der Leichen hat keinen eindeutigen Einfluss auf den histochemischen Befund: positive Reaktionen wurden bei Lagerung im Freien bei LL bis zu 11 und 12 Tagen und bei Lagerung in Wasser bei LL bis zu 8 und 10 Tagen beobachtet.

Tab. 3:

Cystatin C-Anfärbbarkeit von Nebennierengewebe (Absolut- und Prozentzahlen) in Abhängigkeit der Leichenliegezeit (n=442).

LL	Gesamt	C+	
1	43	43	100%
2	47	47	100%
3	56	55	98%
4	75	71	95%
5	59	54	92%
6	38	29	76%
7	31	16	52%
8	21	15	71%
9	6	3	50%
10	13	4	31%
11	12	2	17%
12	3	2	67%
13	2	0	0%
14	1	0	0%
15	10	0	0%
16	5	0	0%
17	4	0	0%
18	3	0	0%
19	0	0	0%
20	1	0	0%
21	11	0	0%
22	1	0	0%
Gesamt	442		

Abb. 4:

Abb. 4a: *Absolutzahlen*

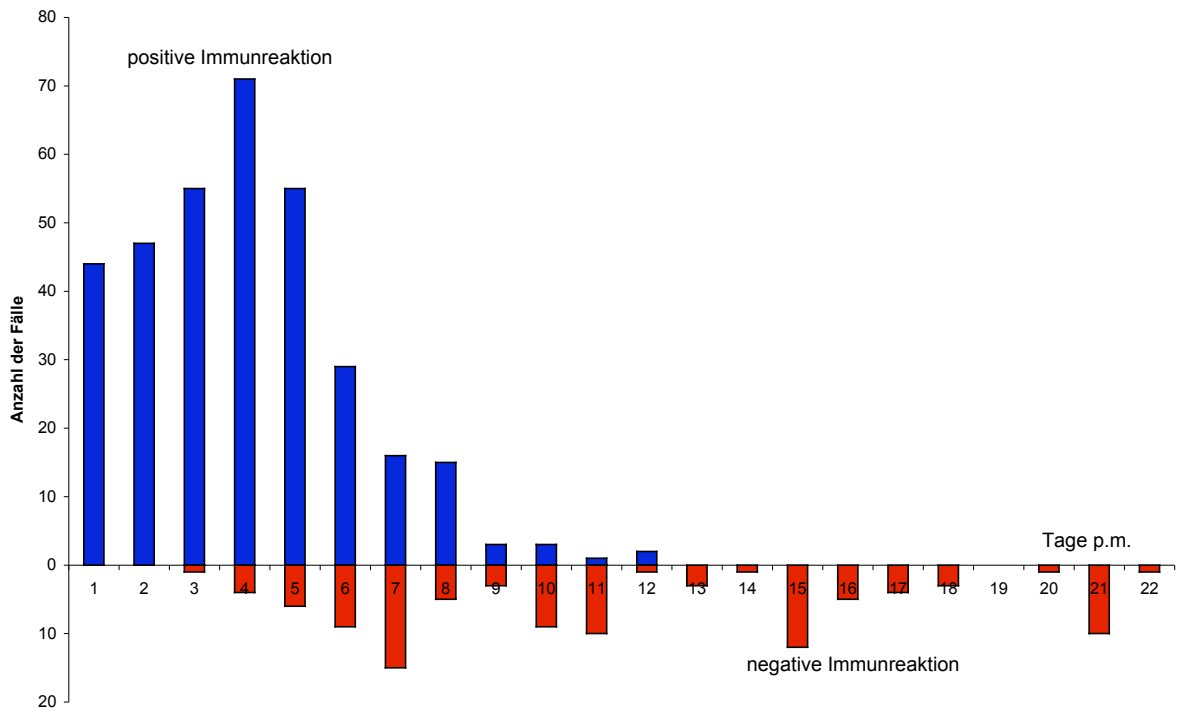
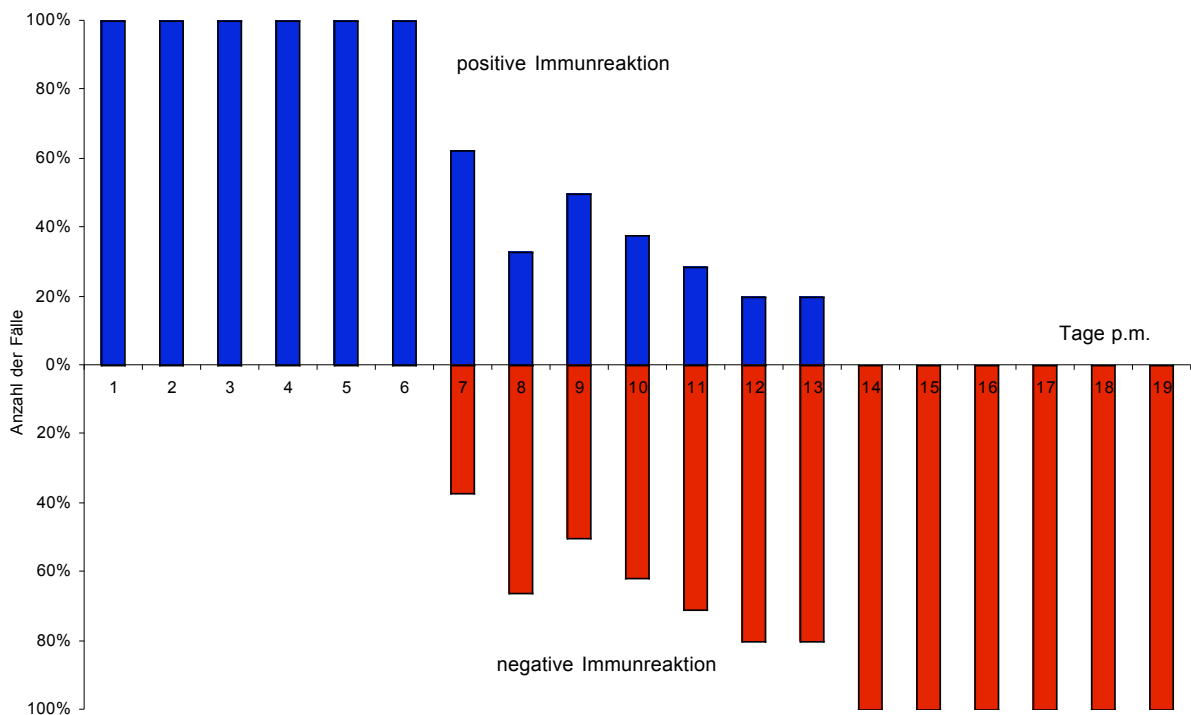


Abb. 4b: *Häufigkeitsdiagramm*



Ergebnisdiagramm der Anfärbarkeit von Cystatin C post mortem

Als sekundäre Endpunkte dienten morphologische Zellveränderungen: Beurteilt wurden die eindeutige Anfärbbarkeit des Zellkerns (N), die einheitliche Struktur der Zellmembran (ZM) und der Nachweis von homogenem Cytoplasma (CP). Die entsprechenden Häufigkeiten in Abhängigkeit von der LL sind in **Tabelle 4** zusammengestellt. Es findet sich eine ähnliche Zeitabhängigkeit wie für die Anfärbbarkeit von Cystatin C.

Tab. 4:

Morphologische Zellveränderungen (Absolut- und Prozentzahlen) in Abhängigkeit von der Leichenliegezeit (n=442).

LL: Leichenliegezeit; N+: intakte Zell-Nuklei; ZM+: intakte Zellmembranen; CP+: homogenes Cytoplasma

LL	Gesamt	N +		ZM +		CP +	
1	43	43	100%	43	100%	42	98%
2	47	47	100%	47	100%	47	100%
3	56	56	100%	55	98%	51	91%
4	75	74	99%	71	95%	69	92%
5	59	58	98%	54	92%	48	81%
6	38	35	92%	24	63%	19	50%
7	31	24	77%	16	52%	6	19%
8	21	18	86%	10	48%	7	33%
9	6	6	100%	1	17%	0	0%
10	13	5	38%	2	15%	1	8%
11	12	3	25%	0	0%	0	0%
12	3	2	67%	1	33%	0	0%
13	2	0	0%	0	0%	0	0%
14	1	1	100%	0	0%	0	0%
15	10	2	20%	0	0%	0	0%
16	5	0	0%	0	0%	0	0%
17	4	0	0%	0	0%	0	0%
18	3	0	0%	0	0%	0	0%
19	0	0	0%	0	0%	0	0%
20	1	0	0%	0	0%	0	0%
21	11	2	18%	1	9%	0	0%
22	1	0	0%	0	0%	0	0%
Gesamt	442						

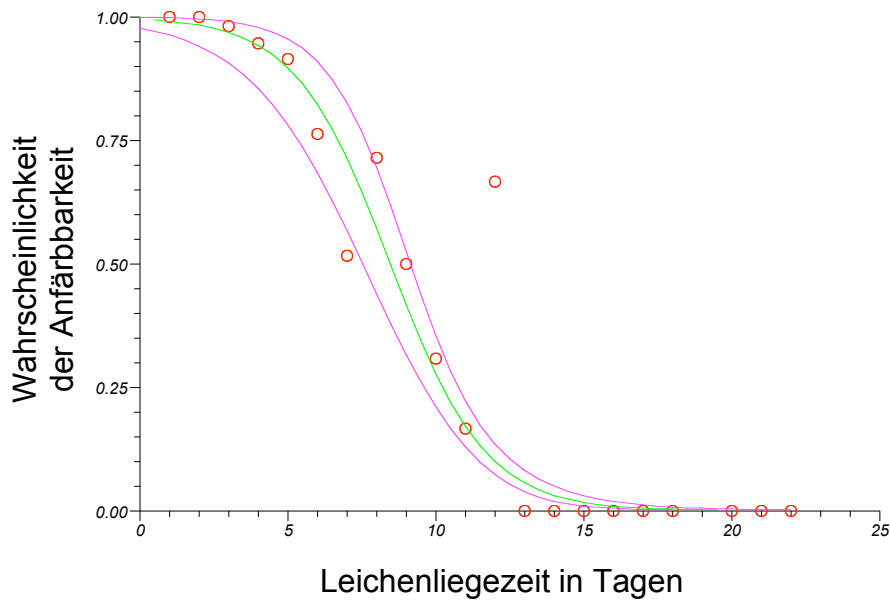
3.2.2 Biometrische Auswertung

Die Wahrscheinlichkeit einer Abhängigkeit der untersuchten Merkmale C+, N+, ZM+ und CP+ von der LL wurde durch logistische Regressionen und relative Häufigkeiten geschätzt und graphisch mit 95%igem Konfidenzband für jeden vorhergesehenen Punkt auf der Regressionskurve dargestellt. In den folgenden Abbildungen (Abb. 5-8) sind die logistische Regression in grünen Kurven, die relative Häufigkeit in orangenen Kreisen und das Konfidenzintervall in violetten Kurven dargestellt. Übereinstimmend zeigen die Kurve einen sigmoidal abfallenden Verlauf.

Für **Cystatin C (Abb. 5)** liegt die 95%ige Wahrscheinlichkeit einer Anfärbbarkeit innerhalb von 3,8 Liegetagen. Ab dem dritten Liegetag fällt die Kurve ab, ab dem 13ten Tag ist Cystatin C erfahrungsgemäß nicht mehr anfärbbar, obwohl die Regression noch etwa 5% anfärbbare Präparate voraussagt. Nach 8,5 Tagen ist der Median erreicht, d.h. es sind gleich viele Präparate anfärbbar wie nicht anfärbbar.

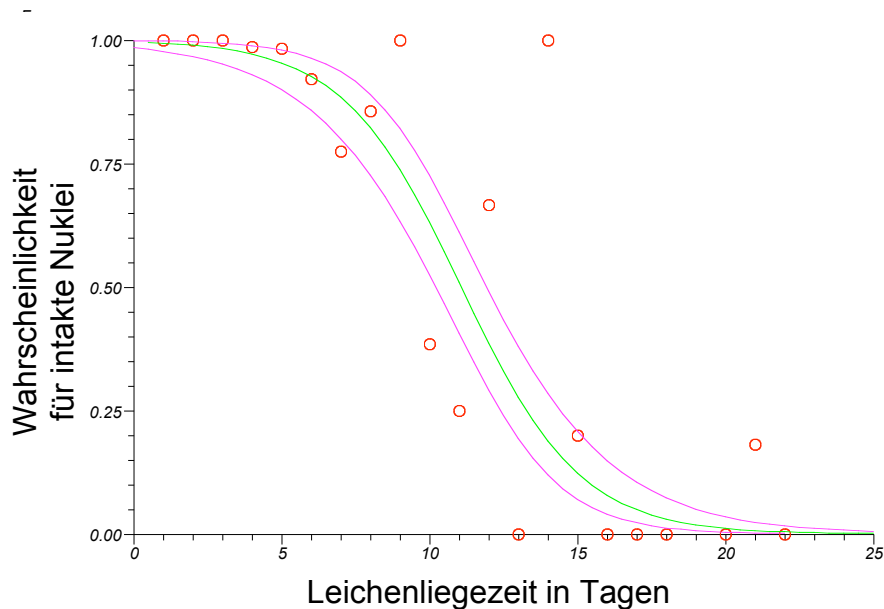
Die Regressionskurven für die sekundären Endpunkte sind in Abb. 6-8 dargestellt. Der **Nukleus (N+, Abb. 6)** ist bis zum 6,4ten Tag mit 95%iger Wahrscheinlichkeit intakt, anschließend fällt die Kurve ab, allerdings deutlich flacher als in Abb. 5. Etwa ab dem 20ten Tag sind keine intakten Nuklei mehr nachweisbar, der Median ist am 10,5ten LL erreicht. Intakte Zellmembranen (**ZM+, Abb.7**) finden sich mit 95%iger Wahrscheinlichkeit bis zum 4,7ten Tag; dann fällt die Kurve ab und vom 12ten Tag sind keine intakten Strukturen mehr nachweisbar; der Median ist am 7,3ten Tag erreicht. Das **Cytoplasma (CP+, Abb. 8)** ist bis zum 4ten Tag mit 95%iger Wahrscheinlichkeit ungetrübt, dann fällt die Kurve steil ab. Ab etwa dem 10ten Tag ist kein homogenes CP mehr nachweisbar, der Median ist bereits nach 6,2 Tagen erreicht.

Abb.5:



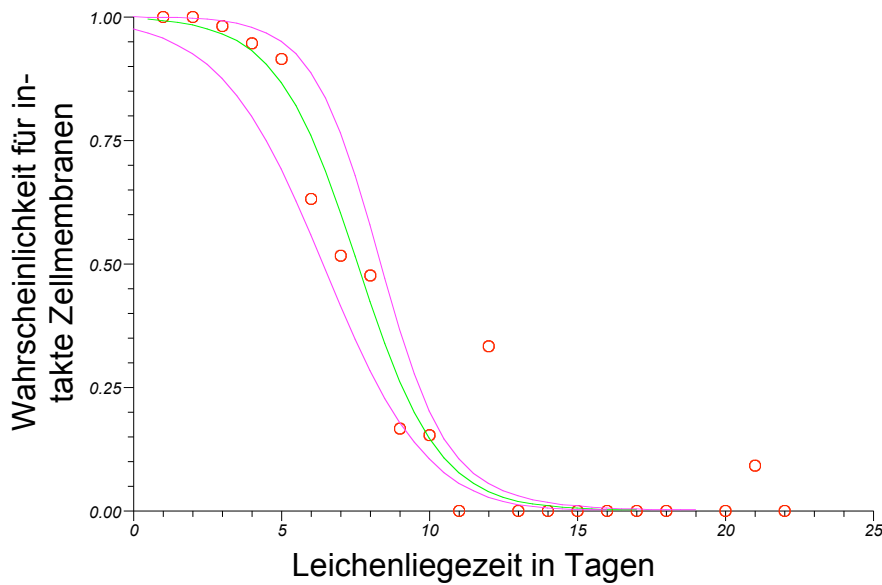
Abhängigkeit der Anfärbarkeit von Cystatin C im Nebennierenmark in Abhängigkeit von der LL mit 95%igem Konfidenzintervall. Die Steigung -0.312 der logistischen Regression ist signifikant von 0 verschieden ($t = -9.1$, $p < 0.0001$).

Abb.6:



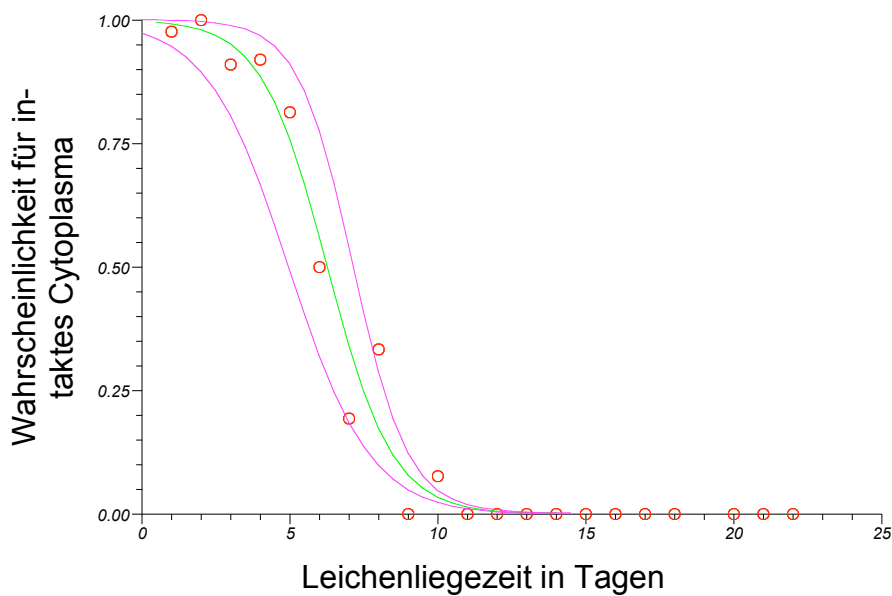
Abhängigkeit des Nachweises intakter Zellkerne (N+) in Abhängigkeit von der LL mit 95%igem Konfidenzintervall. Die Steigung $-5,1$ der logistischen Regression ist signifikant von 0 verschieden ($t = -8.84$, $p < 0.0001$).

Abb. 7:



Abhängigkeit des Nachweises intakter Zellmembranen (ZM+) in Abhängigkeit von der LL mit 95%igem Konfidenzintervall. Die Steigung $-0,44$ der logistischen Regression ist signifikant von 0 verschieden ($t = -9,05$, $p < 0.0001$).

Abb. 8:



Abhängigkeit des Nachweises von intaktem Cytoplasma (CP+) in Abhängigkeit von der LL mit 95%igem Konfidenzintervall. Die Steigung $-4,8$ der logistischen Regression ist signifikant von 0 verschieden ($t = -9,5$, $p < 0.0001$).

Prädiktiver Wert des Verlusts der Merkmale C, N, ZM und CP bei LL größer als der Schwellenwert (S): Die Kenndaten der biometrischen Auswertung, bzw. der Validierung, sind in Tabelle 5 zusammengestellt: In Spalte 1 ist der Schwellenwert der Leichenliegezeiten (S) von 1 bis 21 aufgeführt. In den Spalten 2 und 3 ist die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit welcher „Prävalenz“ (Präv.) genannten Häufigkeit eine längere Liegezeit (LL) als S vorkommt: $Präv. = P(LL > S)$ und umgekehrt, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine kürzere Liegezeit vorkommt: $1 - Präv. = P(LL \leq S)$. In Spalte 4 findet sich die aus dem Verhältnis $Präv./1-Präv.$ errechnete a-priori-Chance einer längeren Liegezeit ($LL > S$) - In den Spalten 5-12 sind die Likelihood Quotienten (LQs) aufgeführt für die Parameter Anfärbbarkeit von Cystatin C (Spalte 5 und 6), Anfärbbarkeit des Nukleus (Spalte 7 und 8), der intakten Zellmembran (Spalte 9 und 10) und des ungetrübten Cytoplasmas (Spalte 11 und 12).“ LQ -“ bedeutet das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer Nichtanfärbbarkeit (oder Nicht-Darstellbarkeit) bei langer Liegezeit zur Wahrscheinlichkeit einer Nichtanfärbbarkeit bei kurzer Liegezeit; umgekehrtes gilt für „LQ+“. In der Tabelle ist jeweils sowohl das Ergebnis eines negativen Testergebnis (LQ C-; LQ N-; LQ ZM-; LQ CP-) als auch eines positiven Testergebnis (LQ C+; LQ N+; LQ ZM+; LQ CP+) wiedergegeben. Wie unter Punkt 2.4 ausgeführt, wird der Test als akzeptabel gewertet, wenn der positive LQ >3 , bzw. der negative LQ $<0,3$ ist und als exzellent, wenn der positive LQ >10 und der negative LQ $<0,1$ ist. Für die fehlende Anfärbbarkeit von Cystatin C (LQ C -) liegt der Faktor bis zum Schwellentag 6 über 10 und beträgt am 21. Tag noch 4.41; für die Anfärbbarkeit von Cystatin C (LQ C+) beträgt der Faktor ab dem 8. Liegetag $<0,3$. In andern Worten ist es unwahrscheinlich, dass ab Liegezeiten von 8 Tagen ein nicht anfärbares Präparat eine kürzere Liegezeit hinter sich hat. Analoges gilt für die anderen Merkmale.

In Spalte 13 und 14 ist der theoretische Fall berechnet, dass alle 4 Parameter pro Schwellenwert übereinstimmend positiv oder negativ ausfallen würden: Es zeigt sich, dass mehrere übereinstimmende Merkmale die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage deutlich erhöhen. Dieser Fall wird aber nicht weiter verfolgt, da

die Parameter jeweils an demselben Schnittpräparat desselben Organs erhoben wurden, also nicht unabhängig von einander sind.

Tab.5:

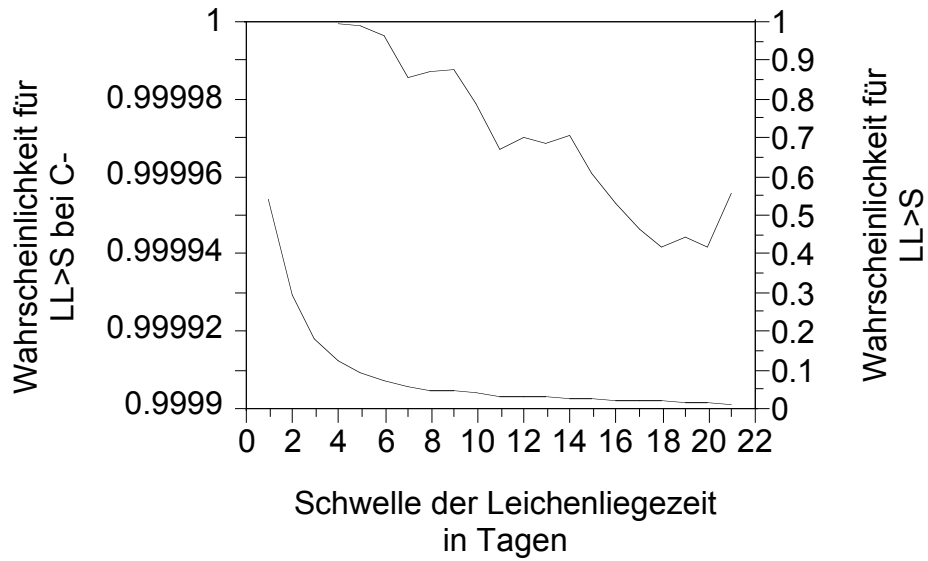
Likelihood Quotienten (LQs) zur Validierung von immunhistochemischen und histologischen Nebennierenbefunden bei der Eingrenzung von Leichenliegezeiten. S = Schwellenwert (in Tagen), LL = Leichenliegezeit (in Tagen)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
LL	Präv P(LL>ll) P(LL>ll)	1-Präv	a-priori- Chance	LQ C- LQ C+	LQ C+ LQ C+	LQ N- LQ N-	LQ N+ LQ N+	LQ ZM- LQ ZM-	LQ ZM+ LQ ZM+	LQ CP- LQ CP+	LQ CP+ LQ CP+	P(LL>ll nur -) P(LL>ll nur +)	P(LL <= ll nur +)
1	0.5458	0.454	1.20184697		0.7469		0.8346		0.7068	16.27	0.6364		0.748
2	0.2945	0.706	0.41740977		0.7131		0.8125		0.6676	38.61	0.5774		0.9147
3	0.1851	0.815	0.22720588	49.32	0.6667		0.777	57.22	0.6123	12	0.5285		0.9633
4	0.1249	0.875	0.14275933	19.2	0.5787	65	0.7091	22.4	0.5046	11.67	0.3876	1	0.9887
5	0.0932	0.907	0.10274199	15.73	0.4545	55.31	0.6093	18.49	0.3521	9.694	0.2219	0.9999999	0.9978
6	0.0761	0.924	0.08236057	11.07	0.3602	31.29	0.5162	9.938	0.2704	6.717	0.1301	0.9999996	0.9995
7	0.0593	0.941	0.06305732	7.395	0.3097	16.89	0.4343	7.505	0.1816	4.761	0.1065	0.999986	0.9998
8	0.0515	0.948	0.05432723	7.837	0.1713	17.47	0.304	6.886	0.0803	4.504	0.0178	0.999987	1
9	0.047	0.953	0.04935555	7.684	0.1369	19.37	0.2367	6.422	0.071	4.256	0.0197	0.999988	1
10	0.0419	0.958	0.04377736	6.916	0.0871	13.72	0.2005	5.672	0.0454	3.929		0.999979	
11	0.0357	0.964	0.036968	6.152	0.0577	10.39	0.1855	4.89	0.0606	3.613		0.999967	
12	0.0339	0.966	0.03503876	6.413		10.63	0.1433	4.917	0.0328	3.544		0.999971	
13	0.0318	0.968	0.03279703	6.246		9.989	0.152	4.814	0.0348	3.5		0.999969	
14	0.03	0.97	0.03088326	6.167		10.3	0.125	4.764	0.0359	3.479		0.999971	
15	0.0264	0.974	0.02707692	5.487		8.922	0.0892	4.305	0.0515	3.283		0.999961	
16	0.0246	0.975	0.02518428	5.21		7.913	0.1128	4.091	0.0651	3.197		0.999953	
17	0.0231	0.977	0.02361239	5.012		7.168	0.1424	3.915	0.0822	3.132		0.999946	
18	0.0213	0.979	0.02173248	4.875		6.6	0.1765	3.771	0.1019	3.086		0.999942	
19	0.0204	0.98	0.02079511	4.875		6.6	0.1765	3.771	0.1019	3.086		0.999944	
20	0.0201	0.98	0.02048303	4.831		6.399	0.1916	3.719	0.1106	3.071		0.999942	
21	0.0144	0.986	0.01458967	4.41		6.785		3.802		2.921		0.999956	

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Zusammenhänge sind für den primären Endpunkt der Studie, nämlich Cystatin C, in den Abbildungen 9 und 10 graphisch dargestellt:

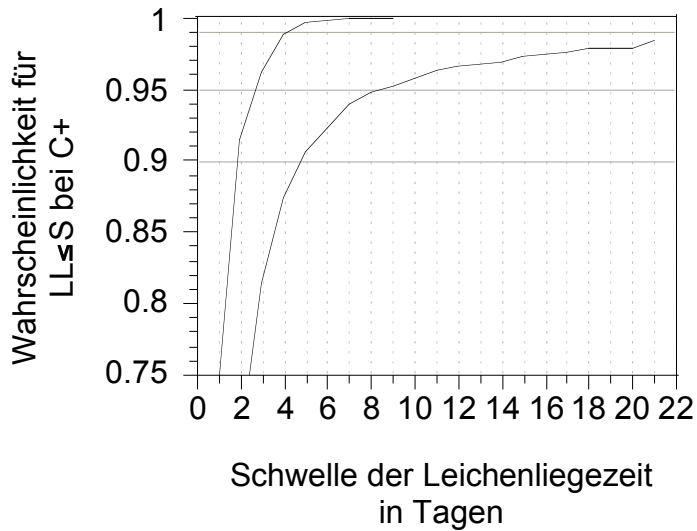
In Abbildung 9 repräsentiert die glatte Kurve (unten) die Prävalenz der Leichenliegezeiten gemäß den Daten des Instituts aus den Jahren 1995-2002 (Tabelle 2), das heißt den Verlauf der unbedingten Wahrscheinlichkeit für $LL > S$ in Abhängigkeit von der Zeit. Die Kurve zeigt einen hyperbol stark abflachenden Verlauf, woraus ersichtlich wird, dass häufiger Leichen mit kurzer, bzw. seltener Leichen mit hoher Liegezeit gefunden werden. Die obere Kurve zeigt den positiven Vorhersagewert, das heißt, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine längere Liegezeit vorliegt, wenn Nicht-Anfärbbarkeit von Cystatin C vorliegt (Tab. 5, "LQ C-"): Dieser Polygonzug zeigt wegen der Präv. -Kurve ebenfalls einen parabolischen, absteigenden Verlauf und besagt, dass bei fehlender Anfärbbarkeit von Cystatin C eine deutlich höhere Leichenliegezeit zu erwarten ist. In Abbildung 10 ist quasi spiegelbildlich dargestellt, mit welcher Wahrscheinlichkeit kurze gegenüber langen Liegezeiten erfahrungsgemäß vorliegen (untere Kurve, Daten gemäß Tabelle 2: 1-Präv.). Der obere Polygonzug zeigt einen steilen steigenden hyperbolen Kurvenverlauf; es wird die kumulierte relative Häufigkeit der Anfärbbarkeit von Cystatin C zur Darstellung gebracht (Tab. 5, "LQ C+"). Aus dem Vergleich der beiden Kurven wird ersichtlich, dass die Anfärbbarkeit von Cystatin C für eine kürzere Liegezeit spricht.

Abb.9:



Wahrscheinlichkeit für $LL > S$ bei C – (obere Kurve, linke Achse) (“fehlende Anfärbarkeit von Cystatin C“, siehe Tab. 5) und Prävalenz oder unbedingte Wahrscheinlichkeit für $LL > S$ (untere Kurve, rechte Achse) (Tab.5).

Abb.10:



Wahrscheinlichkeit für $LL \leq S$ bei C+ (“Anfärbarkeit von Cystatin C“, siehe Tab. 5, obere Kurve) und Prävalenz oder unbedingte Wahrscheinlichkeit für $LL \leq S$ (untere Kurve) gemäß Tabelle 5.

Beispiele: Die praktische Anwendung der Daten aus Tabelle 5 soll an einem Fallbeispiel gezeigt werden:

Bei „Diagnose“ einer LL mit einem *Schwellenwert S von 8 Tagen* beträgt für die Chance einer längeren Liegezeit die a-priori-Chance 0,05433, d.h. mit einer Chance von abgerundet 5,4% % liegt eine längere Liegezeit vor. Wie ausgeführt gibt der Likelihood Quotient (LQ) den Faktor an, um den sich die a-priori-Chance durch Vorliegen eines zusätzlichen Merkmals ändert.

Bei *Nichtvorliegen* der Merkmale „Cystatin C“, „Nukleus“, „Zellmembran“ und „Cytoplasma“ betragen die LQs (Tab. 5, Spalte 5, 7 9, 11):

LQ C - : 7,837; LQ N - : 17,47; LQ ZM - : 6,886 und LQ CP - : 4,504.

Die jeweiligen Produkte ergeben Chancen von 42,5%; 78,6%, 37,4% und 24,5%: Die Chance einer längeren Liegezeit als 8 Tage ist also deutlich bei Nichtvorliegen der Merkmale erhöht.

Bei *Vorliegen der entsprechenden Merkmale* betragen die LQs (Tab. 5, Spalte 6, 8, 10, 12):

LQ C + : 0,1713; LQ N + : 0,304; LQ ZM + . 0,080; LQ CP + : 0,018.

Die jeweiligen Produkte ergeben Chancen von 0,93%; 1,7%; 0,43% und 0,0009%. Sind demnach die geprüften immunhistochemischen oder histologischen Merkmale positiv, ist die Chance, dass eine längere Liegezeit als 8 Tage vorliegt, deutlich gegenüber der a-priori-Chance verringert.

3.2.3 Tierorgane

In den drei Versuchsreihen, welche im Frühling, Sommer und Herbst des Jahres 2002 durchgeführt wurden, wurde die Anfärbarkeit von Cystatin C in Abhängigkeit von der Liegezeit sowie zusätzlicher externer Einflüsse studiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6 und Abbildung 11** zusammengefasst.

Im Überblick aller Daten findet sich auch bei Tierkadavern eindeutig ein Verlust der Anfärbarkeit von Cystatin C in Abhängigkeit von der Liegezeit (Abb. 8).

Bei Lagerung der Kadaver *in geschlossenen Räumen* ergab sich ein recht einheitliches Bild, nämlich ein Verlust der Anfärbarkeit von Cystatin C ab Tag 2 bis 4.

In der Sommer-Reihe war eine Nebenniere am 10. Tag nicht mehr entnehmbar, wahrscheinlich war das Organ durch Autolyse oder durch Madenfraß verloren gegangen. Bei *Lagerung im Freien* war bereits ab Tag 6 bis 8 kein Nebennierengewebe mehr auffindbar. Die Anfärbarkeit war schon ab dem vierten Tag in keiner der drei Serien mehr gegeben (Tabelle 6). Die Anfärbarkeit von Cystatin C ist somit nicht nur von der Liegezeit, sondern erwartungsgemäß auch von anderen Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Befall mit Maden abhängig.

Tabelle 6:

Anfärbbarkeit von Cystatin C in Nebennierengewebe von Tierkadavern in Abhängigkeit von Liegezeit, Jahreszeit und Lagerort. "R": Lagerung in geschlossenen Räumen; "F": Lagerung im Freien; +: Cystatin C anfärbbar; -: Cystatin C nicht anfärbbar; n.v.: keine Nebennieren vorhanden.

Versuchsreihe	Lagerungsort	0 Tage	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
① März	R	+	+	-	-	-	n.v.
② Mai	R	+	+	+	-	-	n.v.
② Oktober	R	+	-	n.v.	-	n.v.	n.v.
Summe %		100	75	25	0	0	0
① März	F	+	+	-	-	-	n.v.
② Mai	F	+	-	-	n.v.	n.v.	n.v.
③ Oktober	F	+	+	+	+	n.v.	n.v.
Summe %		100	75	25	25	0	0

Abb. 11:

Abb. 11a: Absolutzahlen

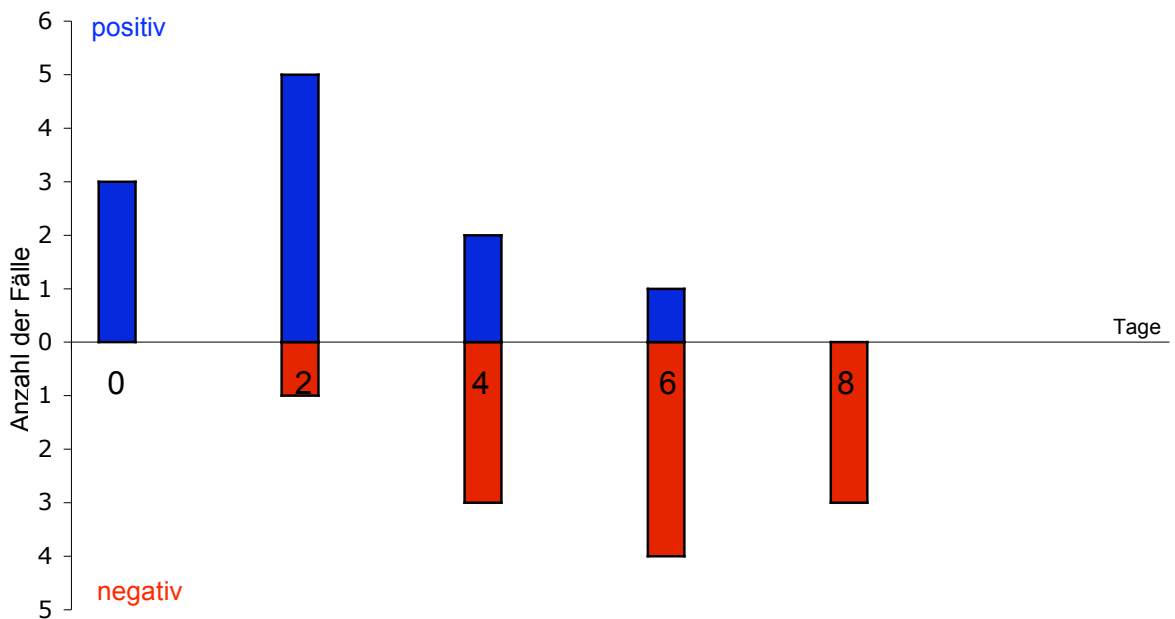
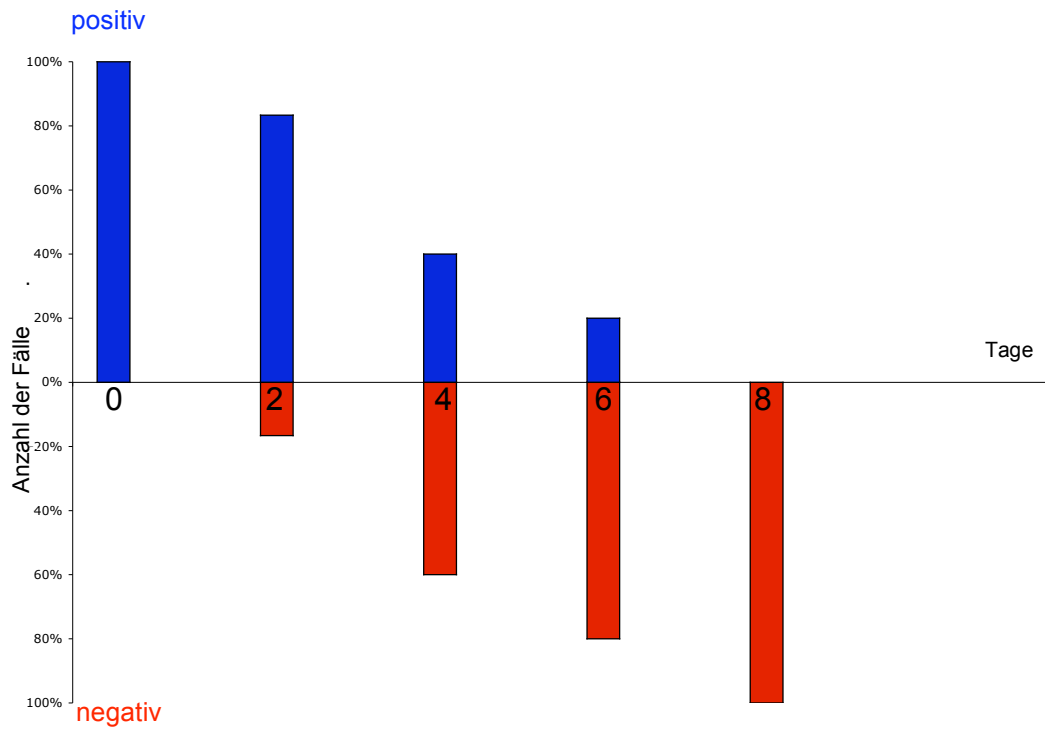


Abb. 11b: Häufigkeitsdiagramm



Ergebnisdiagramm der Cystatin C-Anfärbbarkeit in Nebennieren von Tierkadavern (Zusammenfassung der Daten aus Tabelle 6)

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse und Literatur zum Thema

Postmortale histopathologische Veränderungen sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Solche Befunde sind zwar zum Teil nicht spezifisch, da sie in ähnlicher Form auch bei toxischen und degenerativen Schäden intravital vorkommen können; im Gesamtbild einer forensischen Befunderhebung können feingewebliche Veränderungen aber wichtige Mosaiksteine beisteuern, wenn folgende Fragen beantwortet werden (Janssen 1977):

- handelt es sich um einen vital oder postmortal entstandenen Befund?
- welche zeitlichen Beziehungen sind festzustellen?
- was ist die Ursache des Befundes.

Autolyse und Fäulnisprozesse lassen sich sowohl an einzelnen Zellen als auch an Organen mit histologischen Methoden darstellen. An der Einzelzelle lassen sich lichtoptische Befunde am *Zellkern* verwerten: von der Pyknose bis hin zum totalen Kernverlust gibt es alle Übergänge (Laves 1931). Am *Cytoplasma* finden sich je nach Zellart Zeichen einer trüben Schwellung bis hin zu Verklumpungen und gesamtem Zellzerfall (Mönninghoff 1939). Schließlich lassen sich autolytische Veränderungen auch an *Zellmembranen* nachweisen bis hin zur völligen Lyse. Differentialdiagnostisch kann es große Schwierigkeiten bereiten, diese Veränderungen von solchen Prozessen abzugrenzen, die bei intravitalem Zelltod ablaufen, also bei Nekrose und Apoptose (Janssen 1977). Im Rahmen der Eingrenzung der LL sind die genannten Parameter aber zur Beurteilung des Autolysegrades brauchbar und wurden deshalb unter den skizzierten Kriterien als sekundäre Endpunkte in der vorliegenden Studie mit ausgewertet. Wie aus Tabelle 4 erkennbar ließen sich tatsächlich eindeutige Beziehungen zur LL nachweisen, wobei eine „kadaveröse Trübung“ des Cytoplasmas (Jachau u. Mitarb. 2002) und der Verlust intakter Zellmembranen etwas früher auftraten als die Zeichen von Karyolyse.

Zeitabhängige, postmortale Prozesse sind in zahlreichen Organen mit histologischen und histochemischen Methoden studiert worden, bevorzugt an Haut, Leber, Nieren, Herz, Skelettmuskulatur, Lungen und dem ZNS (Janssen 1977). Trotz detaillierter Kenntnisse über Histologie, Histochemie und Pathohistologie der Nebenniere (Dohm 1990) liegen nur einzelne derartige Berichte aus der forensischen Medizin über dieses Organ vor (Janssen 1977): Aufgrund der zentralen Stellung bei allen akuten und chronischen Stress- und Notfallsituationen (Selye 1976) sind intravital von postmortal entstandene Veränderungen oft kaum zu unterscheiden; zum Beispiel sind postmortal entstandene blutige Erweichungen und Höhlenbildungen von intravitalen Nebennierenblutungen nur sehr unsicher zu unterscheiden (Janssen 1962), und schon bei der Sektion wird häufig ein „autolytisch weiches Nebennierenmark“ beschrieben (Forster u. Mitarb. 1986). Dies dürfte auch ein wesentlicher Grund dafür sein, dass in etwa 2% der Asservate die Nebennieren fehlten. Alle vorhandenen Nebennierenproben konnten aber aufgearbeitet und ausgewertet werden, da sich keine Hinweise auf prämortale Erkrankungen wie Nebennierenapoplexie oder –insuffizienz fanden – im Gegensatz z. B. zu Studien am Pankreas, wo durch Diabetes mellitus verursachte krankheitsspezifische Gewebsveränderungen häufig vorkommen und die Beurteilung erschweren oder gar ein Ausschlusskriterium darstellen (Wehner u. Mitarb. 1999).

In systematischen Untersuchungsreihen haben Wehner u. Mitarb. (1999 – 2002) begonnen, *körpereigene Substrate mit immunhistochemischen Methoden* in verschiedenen Organen darzustellen und mit dem Postmortemintervall in Beziehung zu setzen: in Abhängigkeit von der LL (und zusätzlichen Umwelteinflüssen), dem jeweiligen Organ und dem Substrat war die Immunreaktion bzw. die Anfärbbarkeit in einer Frühphase positiv und in einer späteren Phase negativ. Damit ergab sich jeweils ein „Fenster“ zur Eingrenzung der Leichenliegezeit. Alpha-Antitrypsin in der Leber war während der Tage 0 bis 3 anfärbbar; nach über 10 Tagen nicht mehr anfärbbar (Wehner u. Mitarb. 2002). In der Thyreoidia war Calcitonin von Tag 0 bis Tag 4, Thyreoglobulin von Tag 0 bis Tag 5 anfärbbar, nach über 13 Tagen waren die jeweiligen Immunreaktionen negativ

(Wehner u. Mitarb. 2001 u. 2000); untersucht wurden 136 bzw. 147 Organe mit Leichenliegezeiten bis zu 21 +/- 1 Tagen. Im Pankreas war die Immunreaktion auf Insulin von Tag 0 bis Tag 12, die von Glucagon von Tag 0 bis Tag 13 positiv, nach über 30 Tagen fand sich jeweils keine Anfärbarkeit mehr (Wehner u. Mitarb. 2001); untersucht wurden 128 Organe bei Liegezeiten von 1 bis 45 Tagen.

Die LL wurden den Sektionsprotokollen entnommen, d.h. sie entsprachen i.d.R. den Angaben der Kriminalpolizei, und es muss erfahrungsgemäß im Durchschnitt mit einem Streubereich von +/- 1 Tag gerechnet werden. Nach Henßge (2002) können definierte Todeszeitschlussfolgerungen nur aus Kriterien der frühen Leichenveränderungen (siehe Einleitung) gezogen werden. Dagegen gibt es bislang praktisch keine Regeln, die eine zuverlässige Todeszeiteingrenzung aus dem Ausprägungsgrad der späten Leichenveränderungen erlauben; die Ergebnisse kriminalistischer Ermittlungen, Zeugenaussagen eingeschlossen, haben folglich einen mit der Liegezeit zunehmend hohen Stellenwert (Henßge 2002). Hieraus folgt, dass Zeitangaben für längere LL einen zunehmenden Streufaktor beinhalten, der bei Auswertung und Beurteilung objektiver Merkmale beachtet werden muss: So genannte „Ausreißer“ in Häufigkeitstabellen (z.B. Tab. 3 und 4) oder Regressionskurven (Abb. 5-7) sind hierdurch teilweise zu erklären, insbesondere bei niedrigen Fallzahlen. Hinzu kommt, dass die Auswertung der Schnittpräparate unter Blindbedingungen erfolgte: dies entspricht im Einzelfall nicht der rechtsmedizinischen Praxis, da hier alle Faktoren mitberücksichtigt werden und in Zweifelsfällen zusätzliche Gewebsschnitte angefertigt und berücksichtigt werden können. Kontrollierte Studien an Tierkadavern schließen viele der genannten Unsicherheitsfaktoren aus, beinhalten jedoch die Problematik der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, u.a. aufgrund unterschiedlicher Körpergrößen, Körper- und Organgewichte und Stoffwechselaktivitäten.

4.2 Zu Fragestellung und Methodik:

In Fortsetzung der Studien von Wehner u. Mitarb. (1999-2002) wurde Cystatin C, ein Cysteinproteaseninhibitor, in der Nebenniere untersucht, da proteolytische Enzyme bei postmortalen Prozessen eine wichtige Rolle spielen und diese wiederum durch Proteinkinaseinhibitoren wie Cystatin C reguliert werden (Grubb 2001). Obwohl Cystatin C mit immunhistochemischen Methoden wiederholt zusammen mit Amyloid nachgewiesen werden konnte (Maruyama u. Mitarb 1990; Levy u. Mitarb. 2001) und bisher nicht geklärt ist, ob Cystatin C in der Pathogenese u.a. der Alzheimer'schen Erkrankung, des Down Syndroms, für Alterungsprozesse oder für die Ausbildung cerebraler Insulte eine Rolle spielt, boten sich keine Ausschlusskriterien wegen Erkrankungen bei der Probenauswahl an. Es konnten also alle 442 asservierten Organe untersucht werden.

Bei kurzer LL war in Nebennierenpräparaten Cystatin C mit immunhistochemischen Methoden stets nachweisbar. Bei Anfertigung der Schnittpräparate war aber entscheidend und wichtig, dass das *Nebennierenmark* mit getroffen wurde: In der Rinde sind vergleichsweise nur Spuren anfärbbar. Hier ergeben sich demnach gravierende Fehlermöglichkeiten bei ungeeigneter Schnittführung! - Beim Studium der Literatur hatten sich zunächst keine Mitteilungen über die Anfärbbarkeit von Cystatin C in der Nebenniere finden lassen. Erst nach persönlicher Mitteilung von AO Grubb (2002) wurde eine Arbeit von Löfberg u. Mitarb. aus dem Jahr 1982 gefunden, in welcher analoge Befunde für die Verteilung von „gamma-trace“ in der Nebenniere von Affe und Hund sowie in humanem Phaeochromocytom-Gewebe publiziert worden waren. Löfberg u. Mitarb. führen aus: “ In sections of the adrenal medulla from monkey and dog there was a distinct immunostaining of gamma-trace in the cytoplasm of all epithelial cells No staining of the adrenal cortex occurred.“ Somit stimmen die eigenen Daten mit Literaturangaben über die Verteilung in der Nebenniere überein. Die Befunde für gesundes Humangewebe und für die Maus besitzen Neuheitswert.

Die Cystatine zeichnen sich durch ihre große Stabilität gegenüber hohen Temperaturen (bis zu 100° C) und gegenüber pH-Änderungen (pH 2 bis 12) aus (Otto u. Mitarb. 1997). Die ältesten, in der vorliegenden Studie aufgearbeiteten Nebennieren stammten aus dem Jahr 1995 und waren in Formalin konserviert. Mit der verwendeten immunhistochemischen Methode war keine unterschiedliche Anfärbbarkeit von Präparaten, die aus unterschiedlichen Jahrgängen stammten, nachweisbar. Die Stabilität in konserviertem Zustand ist also hoch. Die Fixierung von Geweben mit Formalin wurde bereits im Jahr 1893 von Ferdinand Blum beschrieben (zit. von Wynnchuk 1992; Shi u. Mitarb. 1997); daher dürften noch viel ältere fixierte Nebennieren-Organen existieren, in denen der Nachweis von Cystatin C versucht werden könnte, insbesondere dann, wenn Fragen zur LL bestehen. Den Effekt anderer klassischer Konservierungsverfahren zu untersuchen wie Kühlung, Lagerung nach Trocknen oder Lagerung in Gegenwart von Antibiotika erscheint ebenfalls lohnend.

4.3 Zu den Untersuchungsergebnissen

In Abhängigkeit von der LL nahm die Häufigkeit der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von Cystatin C im Nebennierenmark von Mensch und Maus ab. Diese Methode wurde aus der Literatur ohne Modifikationen übernommen, d.h. es wurde nicht studiert, ob z.B. durch Variation der Verdünnungen die Methode optimiert werden kann. Da zudem die Färbung in verschiedenen Serien erfolgte und ein „Lern-Effekt“ anzunehmen ist, wurde die Bewertung nur qualitativ durchgeführt und zwischen „anfärbbar“ und „nicht anfärbbar“ unterschieden. Auf die semi-quantitative Beurteilung nach Schweregraden oder eine quantitative photo-optische Evaluation wurde verzichtet – auch im Hinblick darauf, dass die Variable „LL“ erheblichen Schwankungen unterworfen ist, wie bereits die Skalierung in „Liegetage“ (und nicht „Stunden“) erkennen lässt. Wird die Häufigkeit der Anfärbbarkeit von Cystatin C gegen die Leichenliegezeit als logistische Regression graphisch aufgetragen, so resultiert ein signifikanter sigmoidaler Kurvenverlauf (Abb. 5). Damit ist eine Eingrenzung der LL durch den immunhistochemischen Nachweis von Cystatin C möglich. Unter den äußeren Bedin-

gungen, wie sie im süddeutschen Raum herrschen, ist bei Liegezeiten bis zu zwei Tagen stets von einer positiven Immunreaktion auszugehen, bei LL von mehr als 12 Tagen ist in keinem Fall mit einer Anfärbarkeit von Cystatin C zu rechnen. Hiermit ist der Rechtsmedizin ein weiterer Mosaikstein zur Eingrenzung der LL bei unbekannter Todeszeit gegeben. Orientierende Studien an Mäusekadavern ergaben zwar gleichsinnige Ergebnisse. Zusätzlich wurde aber der Einfluss weiterer Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit, Autolyse und Madenfraß deutlich, die neben der LL mitberücksichtigt werden müssen. Denkbar ist z.B., dass Cystatin C länger als 12 Tage im Nebennierenmark histochemisch nachweisbar ist, wenn Leichen in großer Kälte, z.B. auf einem Gletscher aufgefunden werden. Umgekehrtes ist vorstellbar, wenn Leichen tropischem Klima oder längerer Zeit Sauna-Bedingungen ausgesetzt sind.

In der gerichtsmedizinischen Praxis überwiegen bezüglich ihrer Häufigkeit Leichen mit kurzer Liegezeit gegenüber solchen mit langer Liegezeit, wie die Daten des Instituts aus den Jahrgängen 1995 bis 2002 zeigen (Tab. 2). In anderen Worten ist die Prävalenz und damit die Wahrscheinlichkeit der Annahme von kürzeren Liegezeiten größer als die von längeren. Sehr ähnlich war prinzipiell der Zeitverlauf für die Anfärbarkeit von Cystatin C sowie für die histologischen Zellmerkmale. Diese Merkmale boten sich somit als zusätzliche diagnostische Hilfen zur Eingrenzung der LL an. Mit Hilfe von Likelihood Quotienten konnte tatsächlich berechnet werden, dass fehlende Anfärbarkeit von Cystatin C sowie negative histologische Merkmale die a-priori-Wahrscheinlichkeit für ein Vorliegen längerer Liegezeiten deutlich erhöhen, d.h. die untersuchten Merkmale gestatten eine Eingrenzung insbesondere längerer Liegezeiten. Waren die Merkmale jedoch vorhanden, so erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit für kürzere LL. Wenn immunhistochemische und morphologische Parameter übereinstimmten, so ergab sich rechnerisch eine noch deutlich verbesserte Eingrenzbarkeit der Liegezeit. Dies entspricht langjähriger Erfahrung bei der gerichtsmedizinischen Eingrenzung der LL: Die Bestimmung der Postmortalzeit wird umso genauer, je mehr Parameter hierfür herangezogen werden können; allerdings sollten diese Parameter (im Gegensatz zu den beschriebenen Nebennierenbefun-

den) weitgehend unabhängig von einander sein, also nicht an demselben Organ oder gar Organpräparat erhoben werden. Der immunhistochemische Nachweis von Cystatin C im Nebennierenmark ist im Rahmen derartiger Untersuchungen ein gut geeignetes Merkmal.

4.4 Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Es wurde nachgewiesen, dass Cystatin C im Nebennierenmark mit immunhistochemischen Methoden bei Mensch und Tier postmortal zunächst anfärbbar ist und dass dieses Merkmal zeitabhängig verloren geht. Die unter Punkt 1.3 gestellten Fragen lassen sich also wie folgt beantworten:

a Im Nebennierenmark von 90 der 442 Leichen mit einer Liegezeit bis zu zwei Tagen ließ sich in allen Fällen (100%) eine positive und in Proben von 38 der 442 Leichen mit einer Liegezeit über 13 Tagen in keinem Fall eine Immunreaktion gegenüber Cystatin C nachweisen(100%). Die biometrische Auswertung der an insgesamt 442 Organen erhobenen Befunde ergab eine signifikante Abhängigkeit der Anfärbbarkeit von Cystatin C von der LL mit sigmoidal abfallendem Verlauf; nach 8,5 Tagen war der Median erreicht, d.h. es waren gleich viele Präparate anfärbbar wie nicht anfärbbar. Studien an 33 adulten Mäusekadavern ergaben analoge Ergebnisse: Im Nebennierenmark frisch getöteter Tiere war Cystatin C stets immunhistochemisch nachweisbar, nach einer LL von sechs Tagen war keine Anfärbbarkeit mehr detektierbar.

b Orientierende Studien an Tierkadavern zeigten erwartungsgemäß einen deutlichen zusätzlichen Effekt äußerer Einflüsse auf die Anfärbbarkeit von Cystatin C: Die Detektierbarkeit war deutlich verkürzt, wenn die Kadaver bei warmer Witterung im Freien anstatt in klimatisierten geschlossenen Räumen gelagert wurden. Derartige Faktoren müssen daher im Einzelfall mitberücksichtigt werden.

c Ähnliche zeitabhängige Kurvenverläufe wie für die Anfärbbarkeit von Cystatin C ließen sich an Nebennierenmarkzellen auch für histologische Veränderungen

nachweisen (Vorhandensein bzw. Fehlen intakter Zellkerne, intakter Membranen und Homogenität des Cytoplasmas). Unter Berücksichtigung der LL der während der Jahrgänge 1995-2002 im Institut gesammelten 3522 Fälle wurde die Eignung des immunhistochemischen Nachweises von Cystatin C im Nebennierenmark als diagnostischer Test insbesondere für das Vorliegen längerer LL getestet. Es wurden Likelihood-Quotienten berechnet, die Auskunft darüber geben, inwieweit sich die a-priori-Chance für längere LL bei Verlust der Anfärbbarkeit erhöht, bzw. bei nachweisbarer Anfärbbarkeit erniedrigt. Je nach Schwellentag von 1 bis 21 Tagen bietet der Test akzeptable bis exzellente Ergebnisse.

Im Gesamtbild einer forensischen Befunderhebung ist der Verlust der Anfärbbarkeit von Cystatin C somit ein valides Merkmal zur Eingrenzung längerer Leichenliegezeiten.

5 Zusammenfassung

Zur Eingrenzung der Leichenliegezeit (LL) stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, insbesondere für die frühe Todeszeitbestimmung. Ziel der vorliegenden Studie war es zu prüfen, ob der immunhistochemische Nachweis von Cystatin C in der Nebenniere, bzw. die fehlende Anfärbbarkeit bei längeren Zeiträumen einen neuen validen Parameter zur Eingrenzung des Postmorte-intervalls beinhaltet. Cystatin C gehört in die große Gruppe der Cystatine; es handelt sich dabei um niedermolekulare Proteine (110-120 Aminosäuren; MG von 12-13,3 kDa), welche Cysteinproteasen vom Typ des Papains hemmen (**C**ysteinprotease-**I**nhibitor; der Mittelteil des Begriffs „**stat**“ ist von stasis= Stillstand abgeleitet).

Es wurden in Formalin asservierte Nebennierengewebe von 442 Leichen aus den Jahren 1995-2002 ausgewertet mit Liegezeiten zwischen 1 und 21 (+/- 1) Tagen laut Angaben der Kriminalpolizei, bei denen prä mortal keine Nebennierenkrankungen diagnostiziert worden waren. Bezüglich Alter, Geschlecht, Liegemilieu, Todesursachen und Leichenkonstitution bestand Heterogenität. Zusätzlich wurden Kadaver von NMRI-Mäusen untersucht, die im Frühling, Sommer oder Herbst während 0-10 Tagen in beheizten Räumen bzw. im Freien gelagert worden waren. Von den in Formalin fixierten Nebennieren wurden je 2 histologische Präparate/Organ angefertigt. Nach Mikrowellenvorbehandlung der Gewebeschnitte wurde zum Nachweis von Cystatin C ein polyklonaler Anti-Cystatin C-Antikörper vom Kaninchen als Primärantikörper verwendet, als Sekundärantikörper diente biotinyliertes Anti-Kaninchen-F(ab')₂-Fragment. Der Nachweis der spezifischen Antigenbindung erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Komplex Methode. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mikroskopisch unter Blindbedingungen bei schwacher Vergrößerung; als Kriterium diente Anfärbbarkeit bzw. fehlende Anfärbbarkeit von Cystatin C.

Im Nebennierenmark von Leichen mit einer Liegezeit bis zu zwei Tagen ließ sich regelmäßig eine deutlich positive Immunreaktion gegenüber Cystatin C

färberisch nachweisen; die Nebennierenrindenzellen blieben im wesentlichen unmarkiert. Mittels logistischer Regression ließ sich ein statistisch signifikanter, sigmoidaler Kurvenverlauf zwischen der Häufigkeit einer Anfärbbarkeit von Cystatin C in der Nebenniere und der Liegezeit absichern: Innerhalb von 2 Tagen post mortem war die Anfärbbarkeit immer gegeben, was bei einer Liegezeit von mehr als 12 Tagen in keinem Fall zu verzeichnen war. Nach 8,5 Tagen war der Median erreicht, das heißt es waren gleich viele Präparate anfärbbar wie nicht anfärbbar.

Als sekundäre Endpunkte wurden histologische Veränderungen von Nebennierenmarkzellen mit untersucht, nämlich das Vorhandensein bzw. das Fehlen intakter Zellkerne, intakter Membranen und von homogen anfärbbarem Cytoplasma. Auch für diese Merkmale konnten mittels logistischer Regression signifikante, zeitabhängige Veränderungen nachgewiesen werden; die Kurven ähnelten der von Cystatin C.

An Mäusekadavern wurden analoge Befunde erhoben. In orientierenden Experimenten wurden zusätzlich zum Zeitfaktor LL exogene, z.B. klimatische Einflüsse auf die Stabilität von Cystatin C deutlich.

Daten des Instituts von 3522 Verstorbenen aus den Jahrgängen 1995 bis 2002 bestätigten die Erfahrung, dass in der gerichtsmedizinischen Praxis bezüglich ihrer Häufigkeit Leichen mit kurzer Liegezeit gegenüber solchen mit langer Liegezeit deutlich überwiegen; es ergibt sich ein ähnlicher Verlauf der Häufigkeits-Zeit-Abhängigkeit wie für die Anfärbbarkeit von Cystatin C. Die untersuchten Merkmale, vor allem der immunhistochemische Nachweis von Cystatin C, schienen sich also als diagnostischer Test insbesondere für das Vorliegen längerer LL zu eignen. Zur Beurteilung der Qualität dieses Tests wurden Likelihood-Quotienten errechnet, die Auskunft darüber geben, inwieweit sich die a-priori-Chance für längere Liegezeiten bei Verlust der Merkmale erhöht, bzw. bei deren Anwesenheit erniedrigt. Je nach Schwellentag von 1-21 Tagen lieferte der Test akzeptable bis exzellente Ergebnisse.

Schlussfolgerung: Mit dem immunhistochemischen Nachweis von Cystatin C im Nebennierenmark von Mensch und Maus und dem Verlust der Anfärbbarkeit in Abhängigkeit insbesondere von längeren Leichenliegezeiten liefert die Studie im Gesamtbild einer forensischen Befunderhebung einen validierten Mosaikstein für die Eingrenzung des Postmortemintervalls.

6 Literaturverzeichnis

Amendt J, Zehner R, Bratzke H 2003: Forensische Insektenkunde. Dtsch. Ärz-
tebl. 100: A3382-3385.

Barrett AJ 1981: Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. Me-
thods Enzymol. 80: 771-778.

Benecke M 1996 a: Fliegen, Algen und Schnecken als Hilfsmittel und Gegen-
stand kriminalistischer und gerichtsmedizinischer Untersuchungen. Kriminalistik
50: 55-57.

Benecke M 1996 b: Forensische Entomologie am Beispiel eines Tötungsdelik-
tes. Eine kombinierte Spuren-und Liegezeitanalyse. Arch. Kriminol. 198: 99-
109.

Benecke M 1998: Six forensic entomology cases: description and commentary.
J. Forensic Sci. 43: 797-805.

Benecke M 2001: A brief history of forensic entomology. J. Forensic Sci. Int.
120: 2-14.

Belitz H-D, Grosch W 1987: Postmortale Veränderungen im Muskel. In: Belitz
H-D, Grosch W: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo, 471-476.

Bernstein HG, Kirschke H, Wiederanders B, Pollak KH, Zipress A, Rinne A
1996: The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer
disease: a review. Mol. Chem. Neuropathol. 27: 225-247.

Calkins CC, Sloane BF 1995: Mammalian cysteine protease inhibitors: bioche-
mical properties and possible roles in tumor progression. Biol. Chem. Hoppe
Seyler 376: 71-80.

Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivi-
an K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ 2000: A poly-
morphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's
disease. Neurology 55: 763-768.

Dau EI 2001: Kriminalistische Möglichkeiten der Leichenliegezeitbestimmung
sowie der Straftatenaufklärung anhand insektenkundlicher Spurensicherung.
Hausarbeit. Verwaltungsfachhochschule Altenholz, Schleswig-Holstein, 2.

Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW 2001: Elevation of
cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 159:
1061-1068.

Dix J, Graham M 2000: Time of death, decomposition and identification. CRC Press, Boca Raton, 1-14.

Dohm G 1990: Drüsen mit innerer Sekretion. In: Eder M, Gedigk P: Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, 33. Auflage. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona, 462-500.

Duden 1992: Das Wörterbuch medizinischer Fachausdrücke. Dudenverlag, Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich.

Dworkin LD 2001: Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. Current Opinion in Nephrol. Hypertension 10: 551-553.

ETH Zürich 2002: Die C-14- oder Radiokarbonmethode. Internet: <http://www.educeth.ch>

Fechner G, Koops E, Henßge C 1984: Zur Ablassung der Livores unter definierten Druckbedingungen. Z. Rechtsmed. 93: 283-287.

Fossum K, Whitaker JR 1968: Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. Arch. Biochem. Biophys. Acta 125: 367-375.

Foster B, Ropohl D 1986: Thanatologie. In: Foster B (Hrsg): Praxis der Rechtsmedizin. G. Thieme, Stuttgart-New York, 2-36.

Galteau MM, Guyon M, Gueguen R, Siest G 2001: Determination of serum cystatin C: biological variation and reference values. Clin. Chem. Lab. Med. 39: 850-857.

Grubb AO, Löfberg H 1982: Human gamma-trace, a basic microprotein: Amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 3024-3027.

Grubb AO 2001: Cystatin C – properties and use as diagnostic marker. Adv. Clin. Chem. 35: 63-99.

Güttner J, Bruhin H, Heinecke H (Hrsg) 1993: Wörterbuch der Versuchstierkunde. G. Fischer-Verlag, Jena-Stuttgart, 275, 362.

Harms V 1998: Biomathematik, Statistik und Dokumentation 7. Aufl., Harms Verlag, Kiel, 52-72.

Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV 1996: Cystatins in health and disease. Biol. Chem. Hoppe Seyler 377: 71-86.

Henßge C 1982: Temperatur-Todeszeit-Nomogramm für Bezugsstandardbedingungen der Leichenlagerung. Kriminalistik u. forens. Wissensch. 46: 109-115.

Henßge C 2002: Todeszeitbestimmung an Leichen. Rechtsmedizin 12: 112-131.

Henßge C, Madea B 1988: Methoden zur Bestimmung der Todeszeit an Leichen. Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck: 11-12, 97-102

Hilgers R-D, Bauer P, Schreiber V 2002: Bedingte Wahrscheinlichkeiten und diagnostische Tests. In: Einführung in die Medizinische Statistik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg etc.: 79-92.

Hunger H, Dürwald W, Tröger HD 1993: Lexikon der Rechtsmedizin. JA Barth Verlag, Leipzig-Berlin-Heidelberg; Stichwort: "Todeszeitschätzung".

Ith M, Scheurer E, Kreis R. 2001: H-MR-Spektroskopie in der forensischen Medizin: Eine neue Methode zur Schätzung der postmortalen Liegezeit. Rechtsmedizin 11: 161.

Ith M, Bigler P, Scheurer E, Kreis R, Hofmann L, Dirnhofer R, Boesch C 2002: Observation and identification of metabolites emerging during postmortem decomposition of brain tissue by means of in situ ¹H-magnetic resonance spectroscopy. Magn. Reson. Med.: in press.

Jachau K, Krause D 2002: Späte Leichenerscheinungen. Rechtsmedizin 12: 175-186.

Janssen W 1962: Zur Bedeutung der perinatalen Nebennierenblutungen. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 52: 578 (zit. in Janssen 1977).

Janssen W 1977: Spezielle Zell -und Organbefunde. In: Janssen W.: Forensische Histologie. M. Schmidt-Römhild, Lübeck: 29-59.

Kitamura K, Matsui E, Kato J, Katoh F, Kita T, Tsuji T, Kangawa K, Eto T 2001: Adrenomedullin (11-26): a novel endogenous hypertensive peptide isolated from bovine adrenal medulla. Peptides 22: 1713-1718.

Klein A, Klein S 1978: Die Todeszeitbestimmung am menschlichen Auge. Med. Dissertation, Dresden, zitiert in Henßge C, Madea B 1988.

Kobayashi H, Yanagita T, Yokoo H, Wada A 2001: Adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) in adrenal chromaffin cells. Peptides 22: 1895-1901.

Laves W 1931: Histologische Untersuchungen mit gepufferten Farblösungen zum postmortalen Abbau der Kernchromatine und des Plasmas der Leberzellen. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 16: 61 (zit. in Janssen 1977).

Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F 2001: Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60: 94-104.

Lohs K, Elstner P, Stephan U 1999: *Fachlexikon Toxikologie*. Ecomed Verlagsges., Landsberg, 302.

Löfberg H, Nilsson KE, Strömblad L-G, Lasson A, Olsson S-O 1982: Demonstration of gamma-trace in normal endocrine cells of the adrenal medulla and in pheochromocytoma. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 100: 595-598
[jetzt: *European J. Endocrinol.*].

Madea B, Dettmeyer R 2003 : Ärztliche Leichenschau und Todesbescheinigung. *Dtsch. Ärztebl.* 100: A3161-3179.

Maruyama K, Ikeda S, Ishihara T, Allsop D, Yanagisawa N 1990: Immunohistochemical characterization of cerebrovascular amyloid in 46 autopsied cases using antibodies to beta protein and cystatin C. *Stroke* 21:397-403.

Mittmeyer H-J 1978: *Elektrophoretische Untersuchungen über proteolytische Veränderungen an menschlichen Geweben. Ein Beitrag zur Eingrenzung der Todeszeit im späten postmortalem Intervall*. Habilitationsschrift. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Mönninghoff H 1939: Untersuchungen über die Autolyse der Zellen bei „trüber Schwellung“ und „postmortaler kadaveröser Trübung“. *Beitr. path. Anat.* 102: 87 (zit. in Janssen 1977).

Otto H-H, Schirmeister T 1997: Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133-171.

Page MK, Bukki J, Luppia P, Neumeier D 2000: Clinical value of cystatin C determination. *Clin. Chim. Acta* 297: 67-72.

Park HY, So SH, Lee WB, You SH, Yoo SH 2002: Purification, pH-dependent conformational change, aggregation, and secretory granule membrane binding property of secretogranin II (chromogranin C). *Biochemistry* 29: 1259-1266.

Penning R 1996: *Thanatologie*. In: Penning R: *Rechtsmedizin*. Uni-Med Verlag, Bremen-Lorch, 19-32.

Pschyrembel 1998: *Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin-New York.

Reallexikon der Medizin 1971: Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin-Wien.

Reichel M 2000: Forensische Entomologie: Insekten, die stillen Assistenten der Kriminalistik und Rechtsmedizin. Diplomarbeit, Hochschule für öffentliche Verwaltung Bremen.

Roche Lexikon der Medizin 1993, 3. Auflage, Urban u. Schwarzenberg, München.

Schellhorn J, Demme U, Klein A 2002: Kann die systematische Analyse (STA) einen Beitrag zur Todeszeitbestimmung leisten? Rechtsmedizin 12: 310.

Schwerd W (Hrsg) 1986: Rechtsmedizin. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 181-194.

Selye H 1976: Characteristic manifestations of stress: adrenals. In: Selye H: Stress in Health and Disease. Butterworths, Boston-London, 591-598.

Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR 1997: Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. J. Histochem. Cytochem. 45: 327-343.

Stryer L 1988: Biochemie, 4. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-New York: 239.

Thomas L 1992: Wertigkeit (Validität) von Laborbefunden. In: Labor und Diagnose. 4. Aufl. Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg:1860-1864.

Uecker A 1999: Histologische und immunhistologische Untersuchungen zur postnatalen Entwicklung der Nebennieren beim Schwein. Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Uecker A, Brehm H, Amselgruber WM 1999: Chromogranin A and S-100 protein expression in the pig adrenal gland during the postnatal development (Abstract). Annn. Anat., Suppl. 181, 182.

Weber E 1980: Grundriß der biologischen Statistik, 8. Auflage, G. Fischer, Stuttgart, pp.543-556.

Wehner F, Wehner H-D, Schieffer MC, Subke J 1999: Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of insulin in pancreatic beta-cells. Forensic Sci. Int. 105: 161-169.

Wehner F, Wehner H-D, Schieffer MC, Subke J 2000: Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of thyroglobulin. Forensic Sci. Int. 110: 199-206.

Wehner F, Wehner H-D, Subke J 2001: Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of glucagon in pancreatic alpha-cells. Forensic Sci. Int. 124: 192-199.

Wehner F, Wehner H-D, Subke J 2001: Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of calcitonin. *Forensic Sci.Int.* 122: 89-94.

Wehner F, Wehner H-D, Subke J: Eingrenzung der Leichenliegezeit mittels immunhistochemischen Nachweises von α -1-Antitrypsin in der Leber. 10. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin – Region Süd, 14.-16.06.2001 Wien

Wink K 2002: Grundlagen zur Durchführung von Arzneimittel-Studien. PVV-Verlag, Ratingen, pp.35-37.

Wynnchuk M 1992: Minimizing artifacts in tissue processing: the theory of tissue processing. *The J. Histotechnol.* 16: 71-72.

Zsako ST 1916: Die Bestimmung der Todeszeit durch die muskelmechanischen Erscheinungen. *Münch. med. Wschr.* 3: 82-97.

7 Anhang

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
1	13/95	6	-	+	-	-	Whg	1	C7A4	82	m	67	161
2	23/95	4	+	+	+	+	KH	1	F3A7	29	m	67	171
3	47/95	5	+	+	+	+	KH	1	C3A2	61	m	80	176
4	49/95	2	+	+	+	+	KH	1	C7A1	52	m	76	186
5	51/95	4	+	+	+	+	KH	1	B3A0	63	m	89	174
6	95/95	6	+	+	+	+	PH	1	B3C0	49	m	79	186
7	99/95	5	-	+	+	-	Whg	1	B3A0, B3D1, B3D3	71	w	68	160
8	131/95	7	+	+	+	+	Whg	1	B3A1	81	m	adipös	173
9	143/95	9	-	+	+	-	KH	2	B3A0, G1A0	41	w	43	174
10	150/95	5	+	+	+	+	KH	2	B3E1, B3C1	36	m	82	187
11	153/95	5	+	+	+	+	Whg	2	C7A0, C14A0	41	w	66	164
12	155/95	6	-	-	-	-	Whg	2	H5B0	30	m	68	176
13	156/95	7	+	+	+	-	Whg	2	B3F5	40	w	100	183
14	166/95	8	+	+	+	+	Whg	2	B3A2	71	m	82	176
15	170/95	6	+	+	+	+	KH	2	B3A0	83	w	61	163
16	178/95	6	+	+	+	+	KH	2	F3A1	77	m	54	173
17	181/95	8	+	+	+	-	Whg	2	A0A1	38	m	55	184
18	203/95	5	+	+	+	+	KH	2	H5D0	32	m	84	181
19	213/95	4	+	+	+	+	Whg	2	B3A1	79	w	67	164
20	214/95	5	+	+	+	+	KH	2	C3A2	49	m	70	180
21	215/95	7	-	+	+	-	KH	2	B3B3	59	m	84	167
22	230/95	5	-	-	-	-	Im Freien	2	B3A0, E1A4	60	m	60	179
23	247/95	4	+	+	+	+	KH	2	F3A1	68	w	70	148
24	261/95	4	+	+	+	+	KH	2	B3B3	40	m	92	183
25	279/95	7	-	+	+	+	KH	3	C3A2	90	m	50	178
26	290/95	5	+	+	+	+	KH	3	F3A1	85	w	31	150
27	303/95	8	+	+	+	+	Whg	3	A0A1	39	m	77	181
28	332/95	5	+	+	+	+	KH	3	F3A1	43	m	87	174
29	350/95	8	+	+	+	+	KH	3	C3A2	51	w	56	166
30	371/95	5	-	+	+	-	KH	3	C3A0	53	m	91	177
31	384/95	5	+	+	+	+	Whg	3	B3C1	53	w	65	163
32	393/95	3	+	+	+	+	Wasser	3	C11A7, C13A2	22	m	95	193
33	401/95	5	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	23	w	55	163
34	422/95	8	+	+	-	-	KH	3	C3A2	75	m	50	166
35	442/95	4	+	+	+	+	KH	4	C3A2	76	w	60	168
36	453/95	4	-	+	-	-	KH	4	B3C1	68	m	90	162
37	454/95	6	-	+	-	-	Whg	4	B3B3	72	m	40	178
38	464/95	10	+	+	+	-	Wasser	4	B3A1	84	m	67	163
39	473/95	4	+	+	+	+	KH	4	F3A1	25	w	65	156
40	488/95	4	-	+	+	-		4	F3A1	83	m	83	173
41	489/95	2	+	+	+	+	Im Freien	4	B3A1	45	m	108	178
42	525/95	5	-	+	-	-	Whg	4	A0A1	46	w	46	168
43	526/95	7	+	+	+	-	Whg	4	F3A3	46	m	88	180
44	546/95	5	+	+	+	+	KH	4	F3A1	81	w	62	160
45	7/96	5	+	+	+	+	Whg	1	H5B0	20	m	103	191
46	21/96	15	-	+	-	-	Whg	1	B3A1, B2A1	57	m	93	182
47	62/96	8	+	+	+	+	KH	1	C3A2	60	w	adipös	143
48	116/96	21	-	-	-	-	Im Freien	1	A0A1, B2A1	27	m	98	186
49	160/96	5	+	+	+	+	Im Freien	2	C3A2	51	w	58	164

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
50	178/96	4	+	+	+	+	KH	2	C3A2	79	m	84	163
51	184/96	9	-	+	-	-	KH	2	C3A2	58	m	90	157
52	191/96	5	+	+	+	+	KH	2	F3A1	84	w	63	158
53	229/96	18	-	-	-	-	Whg	2	B3A1,B2A1	53	m	95	175
52	191/96	5	+	+	+	+	KH	2	F3A1	84	w	63	158
53	229/96	18	-	-	-	-	Whg	2	B3A1, B2A1	53	m	95	175
54	233/96	4	+	+	+	+	Whg	2	B3A1	63	m		172
54	233/96	4	+	+	+	+	Whg	2	B3A1	63	m	adipös	172
55	236/96	7	+	+	-	-	Whg	2	C7A1, C13A2	31	m	76	183
56	250/96	17	-	-	-	-	Whg	2	A0A1, B2A1	56	m	55	172
57	268/96	5	+	+	+	+	PH	2	C7A5	45	w	43	160
58	269/96		+	+	-	-	Whg	2	B3A1, B2A1,G1A0	56	m	64	176
59	343/96	8	+	+	+	+	Im Freien	3	C7A1	25	m	72	167
60	368/96	8	+	+	+	+	Whg	3	H5D0	45	m	75	174
61	380/96	4	+	+	+	+	Im Freien	3	C7A1, C13A2	61	m	68	171
62	383/96	15	-	-	-	-	Whg	3	B3C1	37	m	66	180
63	403/96	16	-	-	-	-	Im Freien	3	C9A4	83	m	69	167
64	423/96	3	+	+	+	+	Whg	4	B3A0	31	m	77	176
65	433/96	4	+	+	+	+	KH	4	C5A1	44	m	72	173
66	449/96	3	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	61	m	77	179
67	466/96	6	-	+	-	-	KH	4	B3A3	88	m	67	166
68	470/96	5	+	+	+	+	Whg	4	B3A3	68	w	72	163
69	471/96	4	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	47	m	138	178
70	485/96	4	+	+	+	+	KH	4	F3A1	82	w	51	158
71	487/96	5	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	73	m	80	175
72	496/96	3	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	57	m	95	176
73	532/96	8	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	51	m	95	174
74	6/97	4	+	+	+	+	KH	1	B3D1	58	m	57	170
75	8/97	5	+	+	+	+	Whg	1	A0A1	46	m	48	175
76	13/97	6	+	+	+	+	PKW	1	H4A1	56	w	60	160
77	25/97	3	+	+	+	+	KH	1	B3G0	47	m	69	180
78	28/97	5	+	+	+	+	KH	1	F3A3	24	m	85	178
79	48/97	18	-	-	-	-	Whg	1	C12A0	75	w	39	159
80	51/97	4	+	+	+	+	UO	1	C3A0, O2A1	28	m	76	172
81	63/07	5	+	+	+	+	KH	1	B3A1	67	w	69	154
82	64/97	7	-	+	+	+	Whg	1	B3A1	39	m	109	181
83	69/97	7	-	-	-	-	Whg	1	H5B0	22	m	72	182
84	72/97	7	-	+	-	-	PH	1	B3A1	85	w	49	160
85	76/97	6	+	+	+	+	PH	1	H5B0	26	m	66	173
86	83/97	9	-	+	-	-	Im Freien	1	C3A2	43	m	99	175
87	90/97	4	+	+	+	+	PH	1	B3A1	88	m	62	167
88	94/97	7	-	-	-	-	Whg	1	A0A1	54	m	70	168
89	97/97	7	-	-	-	-	Whg	1	H5B0	28	m	72	181
90	102/97	6	+	+	+	+	PH	1	B3B3	62	m	49	123
91	104/97	21	-	-	-	-	Wasser	1	C7A7, G1A1	50	m	78	173
92	128/97	4	+	+	+	+	Wasser	2	C4A1, C13A2	66	m	85	165
93	138/97	4	+	+	+	+	Whg	2	B3F5	39	w	66	168
94	208/97	6	-	+	-	-	KH	2	B3A1	62	m	85	177
95	214/97	11	-	+	-	-	Wasser	3	C7A7	84	m	51	165
96	216/97	5	-	+	+	-	KH	3	B3A1	76	m	87	178
97	234/97	21	-	-	-	-	Whg	3	B3A1	33	m	93	188

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
98	237/97	5	+	+	+	+	PKW	3	C4A0, C13A2	45	m	122	189
99	243/97	5	+	+	+	+	PKW	3	B3A1	64	m	92	178
100	245/97	10	-	-	-	-	Whg	3	C7A2, C13A2, C5A2	49	w	70	158
101	250/97	10	+	+	+	+	Whg	3	A0A1	39	m	88	181
102	269/97	7	-	-	-	-	Whg	3	C7A1, H5B0, C13A2	36	m	58	174
103	275/97	6	+	+	-	-	KH	3	B3C1, N2A1	63	w	adipös	168
104	276/97	1	+	+	+	+	KH	3	H5D0, L2B0	76	m	70	162
105	286/97	7	-	+	+	+	Im Freien	3	G1A1, H5G0	26	m	98	177
106	288/97	5	+	+	+	+	KH	3	F3A3	51	m	77	178
107	307/97	1	+	+	+	+	Whg	3	H5D0, C5A2, C13A2	59	m	92	183
108	313/97	7	-	+	+	+	Whg	3	B3B3	40	m	83	181
109	328/97	7	-	-	-	-	Whg	3	B3A1, B2A1	51	m	64	176
110	378/97	4	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	79	w	75	155
111	380/97	15	-	-	-	-	Whg	4	B3A1, B2A1	61	m	70	170
112	390/97	4	-	-	-	-	KH	4	F3A0	76	m	90	172
113	398/97	5	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	54	m	102	187
114	399/97	5	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	60	m	108	172
115	444/97	3	+	+	+	+	Whg	4	C4A1, C13A2	44	m	72	170
116	3/98	2	+	+	+	+	PKW	4	C4A1, C13A2	35	w	52	169
117	4/98	1	+	+	+	+	Whg	1	C5A1, C14A0	43	m	86	180
118	7/98	12	+	+	+	-	Whg	1	A0A1	66	m	52	181
119	8/98	3	+	+	+	+	KH	1	C3A2, B3A3	86	w	53	145
120	9/98	3	+	+	+	+	KH	1	C3A2	53	w	59	172
121	15/98	3	+	+	+	+	Im Freien	1	H5B0	23	m	80	185
122	16/98	4	+	+	+	+	KH	1	B3A1	78	m	78	165
123	17/98	2	+	+	+	+	Wasser	1	C7A7	85	w	51	155
124	19/98	2	+	+	+	+	KH	1	B3A1	78	m	90	180
125	26/98	11	-	-	-	-	Whg	1	A0A1, C9A4	42	m	46	167
126	27/98	11	+	+	-	-	Whg	1	B314, B3D2	84	w	44	162
127	29/98	3	+	+	+	+	Im Freien	1	H5G0, C13A2	47	w	85	168
128	31/98	2	+	+	+	+	Im Freien	1	C3A4	49	m	75	174
129	33/98	2	+	+	+	+	Whg	1	B3A1	57	m	63	164
130	34/98	2	+	+	+	+	Wasser	1	C7A7, G1A0	66	m	91	173
131	36/98	2	+	+	+	+	Whg	1	B3B3	79	w	78	158
132	38/98	2	+	+	+	+	Whg	1	C9A4	71	w	56	151
133	43/98	2	+	+	+	+	Im Freien	1	C9A2, C13A2	65	m	120	183
134	57/98	6	+	+	+	+	Im Freien	1	C3A2, C1A1	39	m	65	174
135	66/98	5	+	+	+	+	KH	1	F3A1	72	w	57	169
136	68/98	2	+	+	+	+	KH	1	B314	82	m	50	169
137	71/98	3	+	+	+	+	Whg	1	A0A1	27	m	87	178
138	86/98	4	+	+	+	+	Whg	1	B3B3	31	w	77	175
139	87/98	5	+	+	-	-	Wasser	1	C7A7	55	w	65	163
140	113/98	8	-	-	-	-	Whg	2	A0A1, B2A1, B3B3	53	m	95	181
141	119/98	16	-	-	-	-	Whg	2	B314, B3D2	47	m	66	180
142	122/98	8	-	+	-	-	Whg	2	A0A1	55	m	57	175
143	153/98	15	-	-	-	-	Wasser	2	G1A1, H5C0	34	m	82	180
144	154/98	17	-	-	-	-	Whg	2	B3A1, B311	72	m	54	184
145	161/98	1	+	+	+	+	Wasser	2	C7A2, H5C0	57	w	70	167
146	162/98	3	+	+	+	-	KH	2	F3A2	72	m	66	183

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
147	166/98	1	+	+	+	+	Whg	2	H5B1, H5B2	39	m	77	184
148	167/98	1	+	+	+	+	Whg	2	H5B1, H5B2	19	m	62	169
149	168/98	3	+	+	+	+	KH	2	C3A2, B3A0, C12A0	77	w	43	163
150	169/98	2	+	+	+	+	Whg	2	A0A1	61	w	70	161
151	171/98	1	+	+	+	+	Whg	2	B3A1	28	w	51	165
152	173/98	3	+	+	+	+	Whg	2	C3A2, G1A1	56	w	67	169
153	174/98	1	+	+	+	+	Im Freien	2	C5A1, C14A0	18	m	66	182
154	179/98	1	+	+	+	+	PKW	2	F3A3	30	m	84	186
155	185/98	3	+	+	+	+	PKW	2	F3A3	6	w	22	120
156	186/98	3	+	+	+	+	PKW	2	F3A3	29	w	56	150
157	191/98	1	+	+	+	+	KH	2	H5B1	34	m	93	186
158	201/98	13	-	-	-	-	Whg	2	H5C0	28	m	117	189
159	206/98	4	+	+	+	-	Im Freien	2	F3A1	75	w	56	153
160	246/98	11	-	-	-	-	Whg	3	H5D0	31	m	110	182
161	254/98	11	-	-	-	-	Whg	3	B3A0	65	m	80	171
162	284/98	7	+	+	-	-	Im Freien	3	F3A2	27	m	66	170
163	290/98	6	-	+	+	-	KH	3	C3A0	45	m	114	177
164	296/98	6	+	+	+	-	PKW	3	B3A1	53	m	81	175
165	303/98	17	-	-	-	-	Whg	3	A0A1	42	m	68	176
166	311/98	11	-	-	-	-	Whg	3	H5B0, G1A1	35	m	103	192
167	317/98	7	-	+	-	-	Whg	3	H5D0	55	m	65	188
168	321/98	6	+	+	+	+	Whg	3	B3A3	41	w	60	163
169	327/98	1	+	+	+	+	Im Freien	3	B3C1	38	m	75	171
170	328/98	1	+	+	+	+	Whg	3	H5F0	13	w	66	161
171	329/98	4	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	23	m	103	179
172	332/98	1	+	+	+	+	Whg	3	A0A1	35	w	43	152
173	336/98	2	+	+	+	+	KH	3	C3A2	83	w	50	161
174	351/98	4	+	+	+	+	Im Freien	4	F3A2	16	m	59	180
175	345/98	20	-	-	-	-	Whg	4	A0A1, B2A1	57	m	75	178
176	361/98	4	+	+	+	+	KH	4	B3A1	78	w	70	158
177	368/98	2	+	+	+	+	Whg	4	B314, B3D1	60	m	72	172
178	375/98	10	-	-	-	-	Whg	4	H5B0	36	m	58	174
179	393/98	10	-	-	-	-	Whg	4	H5B0	33	m	60	170
180	412/98	3	+	+	+	+	KH	4	C3A0, O2A1	40	m	88	178
181	417/98	2	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	43	m	80	185
182	419/98	2	+	+	+	+	KH	4	C3A2	18	w	30	140
183	420/98	2	+	+	+	+	Whg	4	A0A1, H5B0, H5D0	27	m	70	170
184	421/98	1	+	+	+	+	Whg	4	A0A1, H5B0, H5D0	52	w	65	171
185	424/98	5	+	+	+	+	Im Freien	4	C7A0, C7A6, C14A0	54	m	75	182
186	426/98	3	+	+	+	+	KH	4	H5B0	36	m	84	185
187	428/98	5	+	+	+	+	KH	4	F3A2	46	m	85	182
188	432/98	2	+	+	+	+	Im Freien	4	F3A1	55	m	66	178
189	433/98	8	-	-	-	-	Whg	4	H5D0	47	m	72	181
190	440/98	3	+	+	+	+	Im Freien	4	F3A3	35	m	65	159
191	441/98	1	+	+	+	+	Whg	4	C7A2, C3A0, C14A0	56	w	77	163
192	448/98	4	+	+	+	+	Whg	4	C7A1, C13A2	84	m	70	179
193	450/98	16	-	-	-	-	Whg	4	H3	38	m	50	179
194	452/98	1	+	+	+	+	Whg	4	A0A1	23	m	75	197

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
195	462/98	6	+	+	+	+	Whg	4	H5D0, C9A0	25	m	67	171
196	470/98	1	+	+	+	+	KH	4	C3A0, G1A0	49	m	60	174
197	473/98	7	-	-	-	-	Whg	4	A0A1, H5B0, B3A1	25	m	63	168
198	490/98	8	+	+	+	-	Whg	4	C9A3	36	w	44	162
199	14/99	5	+	+	+	+	Whg	1	B3A0	57	m	44	176
200	17/98	21	-	+	+	-	Whg	1	A0A1	42	m	56	180
201	29/98	4	+	+	+	+	Im Freien	1	C7A6	58	m	75	176
202	31/98	2	+	+	+	+	Whg	1	C3A2	86	w	52	170
203	35/98	3	+	+	+	+	Whg	1	B313	2 Mo.	m	5,3	62
204	37/99	2	+	+	+	+	Im Freien	1	C3A2, B3A5	35	m	87	183
205	38/99	1	+	+	+	+	Im Freien	1	B3A0	23	w	67	170
206	40/99	6	+	+	+	+	Whg	1	B3A0, B3A1	85	w	50	153
207	42/99	4	+	+	+	+	Whg	1	H5B0	23	m	49	169
208	43/99	5	+	+	+	+	Whg	1	B3A0, B3A1	48	m	85	182
209	45/99	3	+	+	+	+	Whg	1	H5B0	24	m	72	185
210	51/99	2	+	+	+	+	Im Freien	1	F3A3	86	m	53	172
211	57/99	5	+	+	+	+	Whg	1	B3A3	46	m	37	172
212	59/99	5	+	+	+	+	KH	1	B3A0, B3A3	67	m	65	181
213	60/99	8	-	+	-	-	Whg	1	B3E1	79	w	72	161
214	61/99	2	+	+	+	+	KH	1	B3(Tumor)	69	m	45	173
215	74/99	11	-	-	-	-	Whg	1	B3C1	49	m	50	168
216	76/99	5	+	+	+	+	Im Freien	1	F3A0	59	m	54	172
217	78/99	2	+	+	+	+	KH	1	B310, B311	72	w	117	180
218	85/99	4	+	+	+	+	KH	1	B3A0	46	m	92	177
219	89/99	15	-	-	-	-	Whg	1	H5B0	24	m	98	185
220	97/99	5	+	+	+	+	KH	1	C3A2, B3C1	76	m	69	176
221	98/99	10	-	-	-	-	Whg	1	B3A0, H5A0	41	m	62	175
222	103/99	1	+	+	+	+	Whg	2	B314	71	w	61	165
223	111/99	10	-	-	-	-	Whg	2	C3A0, B3C1	47	m	68	170
224	118/99	6	+	+	+	-	PH	2	B3A0, B3B2	92	w	30	150
225	127/99	7	+	+	+	-	Im Freien	2	C13A2, H5A0	47	w	61	176
226	132/99	6	+	+	+	+	PH	2	B310	88	m	50	152
227	139/99	1	+	+	+	+	Im Freien	2	H5B0	27	m	66	174
228	149/99	3	+	+	+	+	KH	2	B3A0	3 Mo.	w	5,6	59
229	164/99	1	+	+	+	+	Im Freien	2	C3A2	44	w	62	163
230	166/99	6	-	+	-	-	Im Freien	2	C5A1	31	w	52	161
231	169/99	4	+	+	+	+	Im Freien	2	F3A5	35	m	67	177
232	184/99	15	-	-	-	-	Wasser	2	C7A7	22	m	85	184
233	198/99	3	+	+	+	+	KH	2	C7A4	Ge- burt	w	5,6	60
234	202/99	7	-	-	-	-	KH	2	B3A0	48	w	72	171
235	207/99	15	-	-	-	-	Wasser	2	C7A7	52	m	75	173
236	223/99	5	+	+	+	+	Whg	3	B310	38	m	90	188
237	226/99	3	+	+	+	+	KH	3	C7A5	35	m	76	190
238	227/99	1	+	+	+	-	KH	3	B3C1	35	m	102	177
239	230/99	1	+	+	+	+	KH	3	C5A1	21	m	99	186
240	231/99	7	+	+	+	-	Whg	3	H5B0	28	m	79	184
241	232/99	3	+	+	+	+	Im Freien	3	B3A1	54	m	89	180
242	235/99	7	+	+	+	-	Whg	3	B3C1	51	w	61	167
243	236/99	2	+	+	+	+	Im Freien	3	C3A2, B3B2	30	m	80	179
244	237/99	2	+	+	+	+	Im Freien	3	F3A6	33	m	72	166

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
245	241/99	2	+	+	+	+	Whg	3	B3A0, B3B2	44	m	68	182
246	242/99	3	+	+	+	+	Whg	3	B3C1	17	m	112	198
247	243/99	1	+	+	+	+	Im Freien	3	B3A0	13	w	61	164
248	248/99	4	+	+	+	+	Whg	3	H5A0	39	w	85	164
249	252/99	2	+	+	+	+	Im Freien	3	H5B0	24	m	72	174
250	255/99	3	+	+	+	+	KH	3	C3A2	64	w	80	161
251	270/99	3	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	30	m	71	174
252	274/99	4	+	+	+	+	KH	3	B310	71	m	118	177
253	277/99	6	+	+	+	+	Whg	3	B3A0	27	m	85	178
254	282/99	4	+	+	+	+	KH	3	B3A1	65	w	83	167
255	285/99	3	+	+	+	+	PH	3	B3(Tumor)	78	w	69	169
256	288/99	4	+	+	+	+	KH	3	B314	17	m	51	162
257	291/99	10	-	-	-	-	KH	3	B3B2	40	w	57	161
258	293/99	18	-	-	-	-	Whg	3	C7A1	62	m	80	181
259	295/99	6	+	+	+	+	Whg	3	H5D0	21	w	70	173
260	303/99	8	-	-	-	-	Whg	3	H5B0	24	m	58	189
261	315/99	4	+	+	+	+	Im Freien	3	C3A2	51	w	69	171
262	321/99	5	+	+	+	+	Whg	3	H5D0	53	w	77	163
263	325/99	1	+	+	+	+	PH	4	B3A0	23	m	75	187
264	336/99	4	+	+	+	+	Whg	4	C7A1	36	m	59	163
265	337/99	4	+	+	+	+	Whg	4	A0A1	31	w	71	176
266	338/99	4	+	+	+	+	Whg	4	B3A0	36	w	52	167
267	342/99	6	+	+	+	+	Whg	4	B3A0	74	m	60	170
268	343/99	6	+	+	+	+	PKW	4	B3A0	57	m	103	186
269	351/99	8	+	+	-	-	Whg	4	B3(Tumor)	35	w	60	170
270	357/99	7	+	+	-	-	Whg	4	B3C1	46	m	80	180
271	359/99	14	-	+	-	-	Whg	4	B3A1	86	m	82	175
272	362/99	1	+	+	+	+	KH	4	C4A0	36	w	85	166
273	373/99	4	+	+	+	+	KH	4	B310	64	m	66	167
274	375/99	6	-	-	-	-	Whg	4	H4A0	44	m	74	179
275	377/99	3	+	+	+	+	Whg	4	B3A0	34	m	58	174
276	386/99	3	+	+	+	+	PKW	4	F3A3	18	m	56	180
277	404/99	17	-	-	-	-	Whg	4	B3D1, B3D2	47	m	48	185
278	410/99	6	+	+	+	+	PKW	4	C7A2	28	m	81	182
279	411/99	21	-	-	-	-	Whg	4	C5A1	41	m	80	180
280	412/99	2	+	+	+	+	Whg	4	B3A0, B3B2	61	w	62	155
281	413/99	4	+	+	+	+	Whg	4	C5A1, C13A2	65	w	45	161
282	420/99	4	+	+	+	+	Whg	4	H5F1	43	w	73	167
283	3/00	2	+	+	+	+	KH	1	B310	80	w	58	160
284	5/00	5	+	+	+	+	Whg	1	B3A1	59	m	83	166
285	6/00	4	+	+	+	+	Im Freien	1	H5B0, C7A4	29	m	89	193
286	13/00	5	+	+	+	+	Whg	1	C12A1	18	w	28	172
287	18/00	4	+	+	+	+	Whg	1	B3A1, B3B3	52	w	80	162
288	19/00	21	-	-	-	-	Whg	1	A0A1	71	w	60	172
289	21/00	5	+	+	+	+	Whg	1	C7A6, H5B0	39	m	75	185
290	28/00	4	+	+	+	+	KH	1	B3B2	64	w	45	175
291	41/00	4	+	+	+	+	Whg	1	B3A0	89	m	78	168
292	42/00	5	+	+	+	-	KH	1	B3A0, B3D3	88	m	78	165
293	51/00	15	-	-	-	-	Whg	1	A0A1	58	m	62	179
294	60/00	5	+	+	-	-	Wasser	1	C7A7	66	w	69	161
295	66/00	4	+	+	+	+	Whg	1	H5B0, B3B3	46	m	85	182

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
296	81/00	4	+	+	+	+	Wasser	1	A0A1	74	m	60	158
297	86/00	4	+	+	+	+	Whg	1	B3A0	75	w	57	161
298	104/00	2	+	+	+	+	Whg	2	H5B0	26	m	80	182
299	110/00	4	+	+	+	+	KH	2	B3B3	70	m	56	165
300	117/00	3	+	+	+	+	KH	2	H5B0	33	m	83	184
301	127/00	5	+	+	+	+	Whg	2	H5A0	37	m	71	182
302	129/00	6	+	+	+	+	Whg	2	H5B0	39	m	105	187
303	138/00	8	-	+	-	-	Whg	2	C7A6	31	m	76	183
304	151/00	7	+	+	+	-	Wasser	2	C8A0	33	m	79	180
305	165/00	5	+	+	+	+	Whg	2	H5B0	33	m	117	199
306	169/00	8	+	+	+	-	Im Freien	2	C9A4	88	w	160	165
307	194/00	12	+	+	-	-	Im Freien	2	C7A1	73	m	81	181
308	195/00	6	+	+	+	-	Wasser	2	C11A0, B3A1	10	m	82	167
309	200/00	5	+	+	+	+	Whg	2	A0A1	60	m	56	177
310	201/00	9	+	+	-	-	KH	2	B3A0	80	w	46	156
311	202/00	11	-	-	-	-	Whg	2	B3C1	72	w	52	156
312	211/00	6	+	+	-	-	Whg	2	A0A1	34	m	79	180
313	212/00	21	-	-	-	-	Whg	2	A0A1	60	m	83	182
314	239/00	5	+	+	+	+	KH	3	B3B2	74	w	49	157
315	241/00	12	-	-	-	-	Whg	3	A0A1, G1A1	51	w	48	168
316	244/00	11	+	+	-	-	Im Freien	3	B3A0, C9A4	79	m	62	172
317	247/00	5	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	38	m	81	182
318	264/00	10	-	+	-	-	Whg	3	B3A0	60	m	110	182
319	269/00	1	+	+	+	+	Im Freien	3	H5B0	29	m	60	163
320	303/00	3	+	+	+	+	KH	3	H5B0	29	m	86	182
321	306/00	4	+	+	+	+	PKW	3	C7A6	22	w	61	163
322	311/00	2	+	+	+	+	KH	3	B3B3	27	m	84	187
323	314/00	5	+	+	+	+	PH	3	B3A0	91	w	38	142
324	318/00	4	+	+	+	+	KH	3	B3A1	60	w	61	161
325	320/00	4	+	+	+	+	Whg	3	B3A1	50	w	69	162
326	328/00	5	+	+	+	+	Whg	3	B3A0	80	w	65	159
327	333/00	15	-	+	-	-	Whg	3	B314	47	m	54	177
328	340/00	3	+	+	+	+	Whg	3	B314	62	w	95	170
329	374/00	4	+	+	+	+	KH	4	C3A2	39	m	93	184
330	386/00	5	+	+	+	+	Whg	4	C3A2, B3C1	60	m	69	163
331	395/00	4	+	+	+	+	KH	4	B3C1	44	w	40	166
332	402/00	3	+	+	+	+	KH	4	B3C1	61	m	68	177
333	404/00	3	+	+	+	+	Whg	4	B3A0, B3A1	44	w	65	173
334	408/00	3	+	+	+	+	Im Freien	4	B3A1	53	m	79	176
335	410/00	5	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	86	w	67	162
336	415/00	3	+	+	+	+	PH	4	B313	56	w	91	160
337	427/00	4	+	+	+	+	Whg	4	H5B0	25	m	78	185
338	34/01	7	+	+	+	-	Whg	1	B3A0	71	w	68	164
339	38/01	4	+	+	+	+	PH	1	B3B3	79	w	75	159
340	50/01	4	+	+	+	+	Im Freien	1	H5B0	32	m	82	176
341	63/01	4	+	+	+	+	KH	1	B310	69	w	74	163
342	67/01	4	+	+	+	+	Whg	1	C7A1	39	m	44	175
343	94/01	7	+	+	-	-	KH	1	B3C1	35	m	67	176
344	102/01	4	+	+	+	+	KH	1	B3C1	57	m	72	171
345	107/01	3	+	+	+	+	KH	1	B314, F3A3	26	m	103	175
346	130/01	11	-	-	-	-	Im Freien	1	B3A0	51	m	74	179

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
347	131/01	9	+	+	-	-	PH	1	B3A1	82	m	61	173
348	135/01	10	+	+	-	-	KH	1	B3C1	53	m	65	178
349	169/01	6	+	+	-	-	Whg	2	A0A1, H5B0	34	m	104	188
350	177/01	6	+	+	-	-	KH	2	B310	41	w	50	167
351	187/01	7	+	+	+	+	Whg	2	B3A2	37	w	75	187
352	192/01	9	+	+	-	-	Whg	2	B3A0	78	m	80	170
353	197/01	6	+	+	+	-	Whg	2	H5B0, B3A0	39	w	35	155
354	199/01	3	+	+	+	-	Whg	2	H5B0	42	m	80	185
355	208/01	15	-	-	-	-	Wasser	2	C7A7	52	m	61	169
356	221/01	21	-	-	-	-	Whg	2	B3A1	66	m	68	180
357	231/01	6	+	+	-	-	Whg	2	B3A0, H5B0	17	m	67	180
358	249/01	7	+	+	+	-	Whg	2	B3B0	38	w	46	160
359	253/01	2	+	+	+	+	KH	2	H5B0	34	m	80	182
360	256/01	8	+	+	-	-	PKW	2	A0A1, H5B0	37	m	81	180
361	257/01	4	+	+	+	+	KH	2	B3A1, B3B2	75	w	45	159
362	263/01	3	+	+	+	+	Whg	2	B3A0, H5B0	29	m	90	183
363	265/01	3	+	+	+	+	Whg	2	C7A1	32	w	78	176
364	271/01	4	+	+	+	+	Whg	2	B3A1	67	m	74	177
365	277/01	3	+	+	+	+	KH	2	H5D0, B3(Tumor)	63	m	91	180
366	286/01	16	-	-	-	-	Whg	2	B3C1	56	w	48	168
367	289/01	3	+	+	+	+	Whg	2	C5A1	25	m	65	175
368	295/01	13	-	-	-	-	Whg	3	B3A1	65	m	81	172
369	296/01	4	+	+	+	+	Whg	3	A0A1, H5B0	39	m	68	182
370	299/01	10	-	-	-	-	Whg	3	B3A1	69	m	73	174
371	302/01	1	+	+	+	+	KH	3	B310	75	w	109	161
372	310/01	2	+	+	+	+	Whg	3	C3A2, B314	46	m	56	177
373	312/01	5	+	+	-	-	Whg	3	B3A1	37	w	105	172
374	317/01	21	-	-	-	-	Whg	3	A0A1	86	w	35	165
375	322/01	7	+	+	+	-	Whg	3	B3A0	81	w	73	168
376	330/01	11	-	-	-	-	Whg	3	B3A1	53	m	48	175
377	331/01	1	+	+	+	+	Whg	3	C3A2	38	m	132	182
378	333/01	3	+	+	+	+	KH	3	C3A2, F3A3	40	m	98	169
379	334/01	8	+	+	-	-	KH	3	B3A0	73	w	52	163
380	335/01	1	+	+	+	+	Im Freien	3	H5B0	40	m	69	175
381	336/01	11	-	-	-	-	Whg	3	A0A1	41	w	65	174
382	338/01	3	+	+	+	+	KH	3	B3D3	72	m	58	161
383	339/01	2	+	+	+	+	PKW	3	B314	44	m	68	180
384	341/01	2	+	+	+	+	KH	3	B3C1	50	m	71	174
385	342/01	2	+	+	+	+	Im Freien	3	C3A2	52	w	65	164
386	350/01	5	+	+	+	-	KH	3	B3A0, B3C1	51	m	77	173
387	351/01	2	+	+	+	+	KH	3	B310	78	w	81	154
388	354/01	2	+	+	+	+	KH	3	C3A2, B3C1	41	m	93	190
389	356/01	5	+	+	+	-	KH	3	B3C1	41	m	83	169
390	361/01	1	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	55	w	83	171
391	363/01	3	+	+	+	+	Im Freien	3	B3A1	60	m	82	175
392	366/01	1	+	+	+	+	PKW	3	B314, C4A0	43	m	70	174
393	368/01	2	+	+	+	+	Whg	3	B3A2	34	m	82	187
394	369/01	1	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	34	m	79	170
395	375/01	1	+	+	+	+	KH	3	B310	79	w	83	160
396	376/01	3	+	+	+	+	PKW	3	C7A6	76	m	63	173
397	379/01	1	+	+	+	+	KH	3	F3A1	38	m	72	170

Nr.	AN	LL	C	N	ZM	CP	Ort	Quart	TU	Alter	G	KG	KL
398	380/01	2	+	+	+	+	KH	3	F3A1	45	m	84	176
399	385/01	1	+	+	+	+	Im Freien	3	C9A2,C7A6	47	m	63	185
400	386/01	2	+	+	+	+	Whg	3	B3BB3	43	m	66	175
401	387/01	3	+	+	+	+	Im Freien	3	H5B0	76	m	77	167
402	390/01	2	+	+	+	+	Wasser	3	B3A2	44	w	62	169
403	392/01	1	+	+	+	+	Whg	3	C7A6	65	m	101	174
404	395/01	1	+	+	+	+	Whg	3	C4A0	42	m	75	173
405	396/01	2	+	+	+	+	Whg	3	C7A6	47	m	75	181
406	397/01	2	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	45	w	121	172
407	398/01	4	-	+	-	-	Whg	3	B3A1	77	m	55	160
408	399/01	6	+	+	+	+	KH	3	B314	71	w	45	152
409	400/01	1	+	+	+	+	KH	3	B3C1, B3C1	44	m	92	180
410	401/01	21	-	-	-	-	PKW	3	A0A1	46	m	71	181
411	403/01	1	+	+	+	+	PKW	3	F3A3	21	m	63	172
412	405/01	1	+	+	+	+	Im Freien	3	F3A5	28	m	67	167
413	406/01	1	+	+	+	+	Whg	3	H5B0	27	m	86	180
414	408/01		+	+	-	-	Whg	3	A0A1	46	m	74	174
415	409/01	3	+	+	+	+	PKW	4	F3A3, B3C1	88	m	83	178
416	410/01	3	+	+	+	+	KH	4	B314	66	w	95	157
417	411/01	1	+	+	+	+	Whg	4	C4A0	49	w	72	160
418	414/01	2	+	+	+	+	Whg	4	B310	53	m	75	175
419	415/01	2	+	+	+	+	KH	4	B3G5	72	m	83	183
420	416/01	7	+	+	-	-	Im Freien	4	F3A5	24	w	63	166
421	417/01	4	+	+	+	+	Whg	4	B3C1	46	m	64	165
422	418/01	3	+	+	+	+	Whg	4	B3C1	25	w	82	164
423	419/01	6	-	-	-	-	Whg	4	B3A0	79	w	92	164
424	421/01	4	+	+	-	-	KH	4	B311	33	m	81	175
425	423/01	6	+	+	+	+	Whg	4	A0A1	26	m	89	190
426	434/01	21	-	-	-	-	Wasser	4	A0A1, C7A7	82	m	38	169
427	444/01	4	+	+	+	+	Whg	4	B3A1	69	m	95	175
428	458/01	4	+	+	+	+	KH	4	B3A0, B3B3	62	m	49	168
429	463/01	16	-	-	-	-	Whg	4	B3A0	45	m	57	174
430	482/01	4	+	+	+	+	Wasser	4	C7A7	50	w	56	153
431	500/01	3	+	+	+	-	KH	4	B3B3	71	w	83	160
432	517/01	7	-	+	-	-	KH	4	B3A1	77	m	70	170
433	524/01	3	+	+	+	+	KH	4	A0A1	55	w	75	163
434	526/01	5	+	+	+	+	Whg	4	A0A1	64	m	62	173
435	2/02	10	+	+	-	-	Whg	4	B3A0	85	m	74	176
436	3/02	4	+	+	+	+	KH	4	B3A0, F3A3	59	m	115	180
437	9/02	6	+	+	-	-	PH	4	C3A2, B3C1	96	m	54	170
438	10/02	4	+	+	+	+	KH	1	B314	63	m	79	169
439	14/02	3	+	+	+	-	KH	1	B3B3	74	w	84	170
440	17/02	8	+	+	-	-	Whg	1	B3B2	68	m	79	176
441	23/02	3	-	+	-	-	Wasser	1	C11A0	53	m	83	167
442	24/02	4	+	+	+	+	KH	1	B310	61	m	83	172
443	25/02	21	+	+	-	-	Whg	1	H5B0	61	w	61	164
444	54/02	10	-	-	-	-	KH	1	B310, B3C1	67	m	88	176

Schlüssel:

Nr.	:	Laufende Nummer
AN	:	Asservat-Nummer und Jahr
LL	:	Leichenliegezeit in Tagen
C	:	Cystatin C: nachweisbar(+); nicht nachweisbar(-)
N	:	Nukleus: intakt (+); nicht intakt(-)
ZM	:	Zellmembran: intakt (+); nicht intakt(-)
CP	:	Cytoplasma: homogen(+); inhomogen(-)
Ort	:	Ort bei Eintritt des Todes: Whg: Wohnung, Zimmer, Bett KH: Krankenhaus PH: Pflege-, Altenheim PKW: Auto (Unfall) Im Freien Wasser
Quart	:	Quartal: 1: Januar-März 2: April-Juni 3: Juli-September 4: Oktober-Dezember
Alter	:	Alter in Jahren
G	:	Geschlecht: w: weiblich m: männlich
KG	:	Körpergewicht in kg
KL	:	Körperlänge in cm
TU	:	Todesursache: siehe Archivierungsliste

**Todesursachenschlüssel nach Archivierungsliste der LS-Akten
(in Bezug auf verwendete Kürzel in Datenanhang/Ergebnistabelle):**

A0 ungelöste Fälle

A0A0	Unklarer Fall
A0A1	Nicht geklärt Fall
A0A2	Nicht einzuordnender Fall

B3 Natürlicher Tod

(Nach mittelbar und unmittelbar betroffenen Körperkompartimenten, Allgemeinerkrankungen u.a.)

B3A0	Herz, Kreislauf
B3A1	Herz
B3A2	Aorta, Mediastinum
B3A3	Lungenstrombahn
B3A4	Grosse Venen
B3A5	Kreislauf (Blutdruck)

B3B0	Atemwege
B3B1	Nase, Rachen, Kehlkopf
B3B2	Trachea, Bronchien, Aspiration (aus natürlicher Ursache)
B3B3	Lunge

B3C0	Nervensystem
B3C1	Gehirn
B3C2	Rückenmark
B3C3	Auge, Ohr
B3C4	Peripheres Nervensystem

B3D0	Verdauungsorgane
B3D1	Oesophagus, Magen
B3D2	Darm
B3D3	Leber, Pankreas
B3E0	Urogenitalorgane
B3E1	Niere, Harnwege
B3E2	Männliche Geschlechtsorgane
B3E3	Weibliche Geschlechtsorgane
B3E4	Schwangerschaft

B3F0	Endokrines System, Stoffwechsel
B3F1	Hypophyse
B3F2	Schilddrüse
B3F3	Inselorgan
B3F4	Nebenniere
B3F5	Stoffwechsel

B3G0 Blut- und Lymphsystem
B3G1 Blut
B3G2 Knochenmark
B3G3 Lymphknoten
B3G4 Thymus
B3G5 Milz

B3H0 Binde- und Stützgewebe
B3H1 Knochen
B3H2 Bindegewebe
B3H3 Fettgewebe
B3H4 Haut und Anhangsgebilde
B3H5 Muskelgewebe

B3I0 Allgemeine Erkrankungen
B3I1 Septischer Schock
B3I2 Anaphylaktischer Schock
B3I3 Systemerkrankungen
B3I4 Hypovolämischer Schock

C3 Stumpfe Gewalteinwirkung

C3A0 Stumpfe Gewalt, Allgemein
C3A1 Schlag
C3A2 Sturz
C3A3 Biss
C3A4 Tritt
C3A5 Andere

C4 Schuss, Explosion

C4A0 Schuss Allgemein
C4B1 Explosion

C7 Erstickung, Ertrinken, Badetod

C7A0 Sonstige, nicht klassifizierte Gewalt auf den Hals, Allgemein
C7A1 Erhängen
C7A2 Erdrosseln
C7A3 Erwürgen
C7A4 Atemwegsverlegung, Bolustod, Aspiration
C7A5 Thoraxkompression
C7A6 Sauerstoffmangel
C7A7 Unmittelbares Ertrinken
C7A8 Mittelbares Ertrinken aus natürlicher Ursache
C7A9 Mittelbares Ertrinken aus nichtnatürlicher Ursache

C8 Barotraumatisierung, Tauchunfall

C8A0 Barotraumatisierung, Tauchunfall, Allgemein
C8A1 Barotraumatisierung
C8A2 Tauchunfall

C9	<u>Thermische Traumatisierung</u>
C9A0	Thermische Traumatisierung, Allgemein
C9A1	Verbrühung, Verbrennung
C9A2	Hitzeschock, Sonnenstich, Hitzschlag u.a.
C9A3	Erfrieren
C9A4	Unterkühlung
C11	<u>Elektrotraumatisierung</u>
C11A0	Elektrotraumatisierung, Allgemein
C11A1	Technische Ströme
C11A2	Blitzschlag
C12	<u>Mangelversorgung</u>
C12A0	Mangelversorgung, Allgemein
C12A1	Verhungern
C12A2	Verdursten
C12A3	Pflegeschäden
C13	<u>Selbstverletzung, Suizid</u>
C13A0	Selbstverletzung, Suizid, Allgemein
C13A1	Selbstverletzung
C13A2	Suizid
F3	<u>Verkehrsunfälle</u>
F3A0	Andere Straßenverkehrsunfälle, Allgemein
F3A1	Fußgängerunfall
F3A2	Zweiradunfall
F3A3	PKW-Unfall
F3A4	LKW-, Bussunfall
F3A5	Bahnunfall
F3A6	Flugunfall
G1	<u>Ethanologie</u>
G1A0	Alkoholisierung
G1A1	Ethanolvergiftung
H4	<u>Anorganische Gifte</u>
H4A0	Anorganische Gifte, Allgemein
H4A1	Kohlenmonoxid, Rauchgas
H4A2	Cyanid
H4A3	Metallgifte
H5	<u>Organische Gifte, BTM</u>
H5A0	Organische Gifte, Allgemein
H5B0	BTM, Allgemein
H5B1	Opioide
H5B2	Kokain
H5B3	Cannabinoide

H5B4	Psychostimulantien
H5C0	Psychopharmaka
H5D0	Medikamente (Narkotika, Hypnotika, Sedativa)
H5E0	Analgetika
H5F0	Lösungsmittel
H5F1	Methanol
H5G0	Pestizide, Insektizide

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dipl.-Phys. H-D Wehner danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und für seine hilfreichen Anregungen.

Herrn Dr. med. F. Wehner danke ich für seine intensive und hilfreiche Betreuung bei der Planung, den gewährten Freiraum bei der Durchführung sowie wertvollen Anregungen und Hilfen bei der Auswertung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. vet. W.M. Amselgruber, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, danke ich für die intensive Beratung bei der Auswertung der immunhistochemischen Präparate.

Aus dem Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Schwabe für die Schätzung des Stichprobenumfangs und besonders herzlich Herrn Dr. R. Vonthein für wertvolle Hilfen bei der Auswertung, Darstellung und Validierung der Ergebnisse.

Herrn stud. med. Christian Menzel danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Excel-Tabellen und Herrn stud. Dipl. Soz. Päd. Björn Burk für wertvolle Hilfen bei der Textbe- und verarbeitung.

Frau Rita Rilling, CTA, danke ich besonders für ihre wertvollen Hilfen bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Meiner Mutter, Frau Brigitte Claßen, danke ich für die moralische Unterstützung, meinem Vater, Herrn Professor Dr. Hans-Georg Claßen, für redaktionelle Hilfen und meiner Tante, Dr. Ingeborg Claßen, für die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Name	Ingeborg Britta Claßen
Staatsangeh.	deutsch
07. Mai 1979	Geboren in Stuttgart Mutter: Brigitte Gertrud Claßen, geb. Krause Vater: Prof. Dr. med. Hans-Georg Claßen
1985 - 1989	Grundschule in Plieningen-Stuttgart
1989 - 1998	Paracelsus-Gymnasium Hohenheim-Stuttgart
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife / Abitur
1998 – 2000	Studium der Medizin (Gasthörer) an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
Seit WS 2000 / 2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität zu Tübingen
04. September 2001	Ärztliche Vorprüfung / Physikum
Juli. 2002	Annahme als Doktorandin der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen
2001 / 2005	Anfertigung der Dissertation im Institut für Gerichtliche Medizin der Eberhard Karls Universität zu Tübingen
September 2002	Posterpräsentation: „Eingrenzung der Leichenliegezeit mittels immunhistochemischen Nachweises von Cystatin-C.“; 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Rostock, 24. – 28.09 2002.
28. August 2003	Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung
05. April 2005	Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung
19. Mai 2006	Ärztliche Prüfung

Stuttgart, den 26. Juni 2006