

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Michael Bohnert**

**Immunzytochemische Bestimmung der TMEM119-positiven
Mikroglia-Profilidichte im postmortalen Liquor cerebrospinalis -
ein Parameter zur Beurteilung neuropathologischer Prozesse**



**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Stefanie Heike Trella
aus Schweinfurt**

Würzburg, Mai 2023

Referent: Prof. Dr. med. Michael Bohnert

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

In ewiger Dankbarkeit gewidmet
meinen Eltern

Inhalte, Abschnitte, (Teil-) Ergebnisse sowie Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden vorab bereits am 12.07.2022 publiziert:

[28] Bohnert S, Trella S, Preiß U, Heinsen H, Bohnert M, Zwirner J, Tremblay M, Monoranu CM, Ondruschka B (2022) Density of TMEM119-positive microglial cells in postmortem cerebrospinal fluid as a surrogate marker for assessing complex neuropathological processes in the CNS. Int J Legal Med 136: 1841-50. doi: 10.1007/s00414-022-02863-5

Simone Bohnert, Stefanie Trella, Camelia-Maria Monoranu und Benjamin Ondruschka trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

Der Artikel wurde unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International License lizenziert (siehe <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, Stand 02/2023).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das zentrale Nervensystem	8
1.2	Die Mikroglia	9
1.2.1	Historischer Hintergrund und Ursprung	9
1.2.2	Bau und Funktion der Mikroglia	10
1.2.2.1	Ruhende Mikroglia	11
1.2.2.2	Aktivierte Mikroglia	12
1.2.3	Heterogenität und Plastizität der Mikroglia	14
1.2.4	Differenzierung der Mikroglia	15
1.3	Der Liquor cerebrospinalis	17
1.3.1	Klinische Liquordiagnostik	18
1.3.2	Postmortale Liquordiagnostik	19
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Ethikvotum	23
2.2	Material	23
2.2.1	Probenasservierung und Erstellung der Fallgruppen	23
2.2.2	Parameter	24
2.3	Methoden	25
2.3.1	Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	25
2.3.1.1	Verbrauchsstoffe, Chemikalien und Lösungen	25
2.3.1.2	Antikörper	27
2.3.1.3	Geräte und Hilfsmittel	27
2.3.1.4	Software	28
2.3.2	Immunzytochemie	28
2.3.2.1	Entnahme und Aufbereitung der CSF	28
2.3.2.2	Durchführung der immunzytochemischen Färbung	29

2.3.3	Immunhistochemie	31
2.3.3.1	Entnahme und Aufbereitung des Hirngewebes	31
2.3.3.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	32
2.3.4	Auswertung	34
3	Ergebnisse	37
3.1	Zusammensetzung des Fallkollektivs	37
3.2	Morphologie und Verteilung der Mikroglia	45
3.2.1	Mikroglia im Kortex und der weißen Substanz.....	45
3.2.2	Assoziation der Mikroglia zum vaskulären System	51
3.2.3	Mikroglia in den Zytospin-Präparaten der CSF-Proben	52
3.3	Quantifizierung der Mikroglia-Profile.....	54
3.4	Korrelation der ermittelten Mikroglia-Profildichte mit den erhobenen Daten...	58
4	Diskussion	62
4.1	Fallkollektiv	63
4.2	Methodik	64
4.3	Anti-TMEM119-Antikörper.....	67
4.4	Nachweis von Mikroglia im Hirnparenchym	70
4.4.1	Mikroglia-Profildichte in Kortex und Marklager	70
4.4.2	Morphologie und Verteilung.....	71
4.4.2.1	Kortikale Mikroglia	72
4.4.2.2	Mikroglia im perivaskulären Hirngewebe.....	74
4.5	Nachweis von Mikroglia in der CSF	76
4.5.1	Morphologie und Verteilung.....	76
4.5.2	Übertritt der Mikroglia in die CSF	77
4.5.3	Einfluss der erhobenen Fallparameter auf die Mikroglia-Profildichte in der postmortalen CSF	80
4.5.3.1	Zusammenhang der CSF-Intensität mit Gehirngewicht, Sterbealter und Geschlecht.....	80

4.5.3.2	Einfluss der Todesursache auf die CSF-Intensität	81
4.5.3.3	Effekte von Reanimationsmaßnahmen auf die CSF-Intensität ..	81
4.5.3.4	CSF-Intensität in Abhängigkeit vom PMI.....	82
4.6	Limitationen.....	85
4.7	Ausblick.....	86
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis.....	89
Appendix	107
I.	Abkürzungsverzeichnis.....	107
II.	Abbildungsverzeichnis.....	109
III.	Tabellenverzeichnis.....	110
IV.	Danksagung	111
V.	Lebenslauf.....	112
VI.	Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme	113

1 Einleitung

1.1 Das zentrale Nervensystem

Das zentrale Nervensystem koordiniert die komplexe Funktionsweise des menschlichen Organismus. Topographisch unterscheidet man zwischen dem peripheren (PNS) und zentralen Nervensystem (ZNS), wobei Letztgenanntes in Gehirn und Rückenmark unterteilt wird [123, 138, 180]. Im Wesentlichen besteht das Nervengewebe aus zwei unterschiedlichen Zellarten [52, 91]. Während die Nervenzellen oder Neurone(n) die direkte Informationsverarbeitung und -weiterleitung untereinander übernehmen, wird das übrige Gewebe durch Gliazellen gebildet [91], die etwa die Hälfte der Gesamtzellzahl des ZNS ausmachen [6, 12, 13]. PNS und ZNS unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Gliazellen [91]. Unter dem Begriff der Neuroglia des ZNS werden Makroglia, bestehend aus Astro- sowie Oligodendrozyten [86], und Mikroglia zusammengefasst [10, 52, 91]. Jeder einzelnen Zellart kommen spezifische Aufgaben zu [62]. Oligodendrozyten sind auf direkte Weise am Informationsaustausch und der Reizweiterleitung beteiligt, indem sie lipidreiche [86] Myelinscheiden um Axone von Nervenzellen bilden und eine schnelle sowie sichere Informationsweiterleitung von Neuron zu Neuron ermöglichen [91, 167]. Astrozyten hingegen zeichnen sich durch ihre ausgeprägten, sternförmig imponierenden Zellausläufer aus [91, 186] und besitzen im Gewebe eine Stützfunktion [167]. Zudem tragen sie in Ergänzung zum Kapillarendothel durch ihre Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke („*blood brain barrier*“, BBB) zur Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb des ZNS bei [34, 57, 86, 91]. Die strenge Trennung des ZNS vom Blutkreislauf wird durch die BBB garantiert [1, 18, 74, 80], indem sie als selektive Barriere und Transporter zwischen Blutbahn und Hirngewebe fungiert [44]. So werden möglichst konstante Bedingungen für das empfindliche Nervensystem geschaffen [104] und ebenfalls zum immunologischen Schutz beigetragen [1]. Für den Organismus ist ein voll funktionsfähiges Immunsystem unverzichtbar [140]. Das ZNS nimmt in dieser Hinsicht eine Sonderstellung ein [23]. Die BBB verwehrt den peripheren Immunzellen unter physiologischen Bedingungen den Eintritt in das ZNS [185]. Zum Aufbau eines wirksamen Schutzes gegen äußere Eingriffe wird demnach ein eigenes „Immunsystem“ benötigt [186], dessen Hauptakteure die Mikroglia darstellen [77, 156]. Sie machen einen Anteil von bis zu 20 % der Gliazellen [15, 167, 186] sowie schätzungsweise bis zu etwa 10 % der Gesamtzellzahl des ZNS [62, 117, 169] aus.

1.2 Die Mikroglia

Mikroglia gehören zur Gruppe der Neuroglia und finden sich ubiquitär im Neuropil des ZNS verteilt [97, 149]. Sie stellen die gewebständigen, residenten Makrophagen des ZNS [11, 55, 62, 69, 72, 97, 162, 164, 172] als Teil des mononukleären-phagozytären Systems (MPS) [23, 77] dar und repräsentieren das angeborene Immunsystem [41, 45, 98], indem sie u. a. immunregulatorisch wirken [69]. Mikroglia unterscheiden sich damit hinsichtlich ihrer Funktion deutlich von den übrigen Gliazellen im ZNS [167]. Zeitgleich kommt den Zellen eine ebenso wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Homöostase zu [69]. Mikroglia können als Bestandteil des Neuropils von den übrigen Makrophagen des ZNS abgegrenzt werden, die im perivaskulären und meningealen Raum sowie im Bereich der Plexus choroidei der Ventrikel zu finden sind [77, 112, 151, 206]. Das Verteilungsmuster der Mikroglia innerhalb einzelner Hirnareale scheint variabel zu sein [11, 69, 108].

1.2.1 Historischer Hintergrund und Ursprung

Zu den ersten Beschreibungen der Mikroglia zählt Nissls Beschreibung der „Stäbchenzellen“, die er für phagozytierende und bewegliche Neuroglia hielt [15]. Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts galt es als erwiesen, dass das ZNS aus drei verschiedenen Zelltypen bestehe. Cajal differenzierte erstmals das sog. „dritte Element“ von Neuronen und Neuroglia [58, 68, 77]. Mittels einer Silberkarbonatimprägnierung erbrachte schließlich Rio-Hortega 1932 den Nachweis, dass Cajals Element aus zwei unterschiedlichen Abkömmlingen bestehe [58, 174] und man Oligodendrozyten von Mikroglia unterscheiden müsse [68]. Zudem gelang es ihm auf diese Weise, die Zellmorphologie der Letztgenannten spezifisch darzustellen [97]. Rio-Hortega schrieb den Mikroglia eine herausragende Rolle in der Immunabwehr des ZNS zu [186] und ging von einem mesodermalen Ursprung aus [58, 97, 186]. Die Zellen würden von eingewanderten, meningealen Makrophagen abstammen [69] und sowohl zur Phagozytose als auch Migration befähigt sein [68]. Im Verlauf wurde die Herkunft der Mikroglia jedoch kontrovers diskutiert. Weitere Hypothesen gingen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle von Astrozyten und Mikroglia [58] und damit von einem neuroektodermalen Ursprung der Zellen aus [45, 68, 69, 104]. Bereits 1933 sah man einen möglichen Zusammenhang zum retikulohistiozytären System (RHS) und einer potenziell monozytären Abstammung [68, 203]. Neuronale Zelluntergänge während der Entwicklung des Nervensystems wurden als Anreiz für Monozyten angesehen, in das

Gewebe einzuwandern und damit die Vorläufer der späteren Mikroglia zu bilden [69, 186]. Des Weiteren wurden Hypothesen aufgestellt, Mikroglia würden ursprünglich vom subependymalen Gewebe der Seitenventrikel abstammen [68], aus dem perizytären Raum ins Hirngewebe einwandern oder sogar speziell aktivierte, modifizierte Perizyten darstellen [132]. Nach heutiger Auffassung ist man sich weitestgehend einig, dass Mikroglia mesodermalen Ursprungs sind und von Progenitorzellen abstammen, die zunächst im Dottersack lokalisiert sind [45]. Im Mausmodell konnten Vorläuferzellen im embryonalen Dottersack [7, 23, 67, 118, 172] nachgewiesen werden, die im Verlauf der frühen Fetalperiode das ZNS besiedeln [68, 76, 201]. Angenommen wird, dass Mikroglia vor Ort in situ proliferieren und sich letztlich im Verlauf der Entwicklung zu voll funktionsfähigen Zellen differenzieren [7]. Je nach Entwicklungsstadium durchlaufen die Zellen hierbei verschiedene Stadien [75]. Es wird angenommen, dass die Zellzahl der langlebigen Mikroglia [11, 77, 150] über die Lebensdauer des Individuums durch Proliferation in situ annähernd konstant aufrechterhalten werden kann [11, 71, 76, 129].

1.2.2 Bau und Funktion der Mikroglia

Mittels unterschiedlichster Funktionen nehmen die Mikroglia nicht nur eine herausragende Rolle in der Aufrechterhaltung der lebensnotwendigen Homöostase im zentralnervösen Kompartiment ein. Sie stellen darüber hinaus einen essenziellen Bestandteil der Pathophysiologie des ZNS dar, indem ihnen insbesondere im Zuge neuroinflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle zukommt [185, 201]. Mikroglia sind befähigt, an ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl unterschiedlichster Rezeptoren zu exprimieren, die es ihnen ermöglichen, sensitiv auf äußere Stimuli reagieren zu können. Sie gelten als die empfindlichsten Zellen des ZNS [11]. In enger Interaktion mit dem neuronalen Netzwerk und den übrigen zentralnervösen Zellen [45] sind Mikroglia in der Lage, ihre physiologischen Eigenschaften dynamisch an die jeweils vorherrschenden Gegebenheiten anzupassen. Bereits während der Entwicklung des ZNS leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur Modellierung und Entwicklung des frühen Nervensystems sowohl im prä-, peri- als auch postnatalen Stadium [45, 112]. In Gestalt von Makrophagen [23] sind sie im Stande, abgestorbene Nerven- und Gliazellen sowie Zelldebris aus dem Hirngewebe zu entfernen [11, 62, 186]. Weiterhin können sie sowohl das Überleben als auch den Zelltod von Neuronen über die Ausschüttung bestimmter Botenstoffe [112] aktiv initiieren [62, 112]. Im Zuge des sog. „*synaptic*

prunings“ sind Mikroglia zudem im Stande, axonale Verbindungen modifizieren oder gar lösen zu können [11, 45]. Im Zusammenspiel mit Astrozyten [6] und im direkten Zellkontakt zu ihrer unmittelbaren Umgebung tragen sie damit einen erheblichen Anteil zur neuronalen Plastizität bei [23, 41, 75, 112, 129, 167, 197, 201]. Darüber hinaus tragen perivaskulär angesiedelte Mikroglia zur Unterstützung der Astrozyten, Perizyten und des Kapillarendothels zur Aufrechterhaltung der BBB bei [201]. Unter pathophysiologischen Bedingungen sind Mikroglia im Zuge des sog. „*synaptic stripping*“ im Stande, unbrauchbare und überflüssige Verbindungen zu geschädigten Neuronen entfernen zu können [11, 76, 98]. Mikroglia sind somit direkt in den Aufbau und die Verschaltungen der Synapsen bzw. des gesamten ZNS involviert [75] und scheinen darüber hinaus auch regulierend auf Neuro- und Angiogenese einwirken zu können [11, 201]. Im ausgereiften Nervensystem übernehmen sie vorwiegend eine Überwachungs- und Kontrollfunktion [80, 139]. Im Zuge dessen weisen Mikroglia eine enorme Heterogenität und Diversität auf [148]. Variable Zellkonformitäten als auch unterschiedliche Gen- und Proteinexpression sind dabei Folge unterschiedlichster Einflüsse, die auf die Zellen einwirken. Hierzu zählen neben Alterungsprozessen auch jegliche physio- bzw. pathologischen Stimuli [11]. Diese Signale führen zu einer kontextspezifischen Aktivierung der Zellen, die wiederum u. a. mit morphologischen Veränderungen der Mikroglia einhergeht [11, 45]. Folglich wurden in der Vergangenheit sowohl funktionell als auch strukturell mehrere Subtypen der Mikroglia unterschieden [77].

1.2.2.1 Ruhende Mikroglia

Unter physiologischen Bedingungen sind die Mikroglia im Neuropil des ZNS zwischen Neuronen und Nervenfasern lokalisiert [139]. In diesem Zustand wurden sie deshalb meist als „*resting microglia*“ bezeichnet [98]. In der Literatur fand sich stellenweise auch der Begriff des M0-Subtyps [115, 172] oder die Bezeichnung der „*surveilling microglia*“ oder „*ramified microglia*“ [11, 114]. Der Ausdruck „ruhend“ ist dabei jedoch irreführend, da sich die Zellen zu keinem Zeitpunkt in einem inaktiven Zustand befinden [97]. Nimmerjahn et al. konnten experimentell nachweisen, dass sich Mikroglia auch in diesem Zustand dynamisch aktiv sind [139]. Resting microglia sind charakterisiert durch einen kleinen Zellkörper [11, 97, 98] und einer Vielzahl von langen [75], beweglichen [11] und verzweigten Zellausläufern [23], die sich dreidimensional [150] in der direkten Umgebung ausbreiten [98]. In welcher Form sich die Zellvorsprünge ausrichten ist u. a.

von der Menge an Raum abhängig, der ihnen im Gewebe zur Verfügung steht [186]. Sie dienen der Kontrolle des Extrazellulärraumes sowie des Neuropils [11, 46, 75, 97, 136, 139, 150, 159, 186]. Die Fortsätze reichen dabei ins Gewebe oder stehen im direkten Kontakt zu benachbarten Gliazellen [45], Nervenzellen und Axonen oder Gefäßen [11]. Mikroglia sind durch ihre Zellausläufer im Stande, innerhalb von Minuten (min) auf Störungen der Homöostase zu reagieren, indem sie ihre Vorsprünge in Richtung der betreffenden Pathologie oder des Stimulus hin bewegen [112, 139, 186] und mit ihrem Zellkörper in Richtung eines potenziellen Parenchymschadens migrieren [112].

1.2.2.2 Aktivierte Mikroglia

Die Fähigkeit, jegliche Veränderungen im ZNS detektieren zu können, erhalten die Mikroglia durch die Vielzahl spezieller Rezeptoren und Transportern entlang ihrer Fortsätze [11]. Die Zellen reagieren grundsätzlich auf Stimuli von außen, seien es Pathogene [119] und Infektionen, Zellschäden wie bspw. infolge von Ischämien, Neuroinflammation, Traumata oder auch neurodegenerative Erkrankungen [15, 52, 77, 97, 104, 105, 117, 159, 182, 217]. Weiterhin konnten eine Vielzahl von Triggern bzw. reizauslösenden Substanzen identifiziert werden. Hierzu gehören u. a. Lipopolysaccharide (LPS) auf der Oberfläche von Krankheitserregern, einzelne Proteine wie bspw. β -Amyloid [119], Neurotransmitter, Plasmabestandteile [45] oder auch Zytokine [52, 76]. Durch anschließende Rekrutierung von Mikroglia anderer Hirnregionen kommt es zur Erhöhung der Zellzahl am Ort des Stimulus [94]. Wird die BBB verletzt oder durchlässig kommt es zusätzlich zur Durchmischung der Mikroglia mit peripheren Blutzellen, die unter pathologischen Bedingungen das Parenchym des ZNS infiltrieren [76]. Grundsätzlich geht man davon aus, dass die Reaktion der Mikroglia auf einer „Aktivierung“ aus ihrem physiologisch ruhenden Zellstatus beruht. Nach Aktivierung kommt es sowohl zu einer strukturellen Konformitätsänderung der Zellmorphologie als auch durch abweichende Genexpression bedingt zu einem veränderten Aufbau der Zelloberfläche, neuen Signalwegen [119] sowie der Produktion unterschiedlichster Botenstoffe und Oberflächenmoleküle [150]. Der Übergang in den aktivierten Zustand charakterisiert sich klassischerweise durch ein Verkürzen der Zellausläufer [97, 186, 201] unter Ausbildung einer eher amöboid imponierenden Zellkonformität [97, 119, 201] mit rundlichem Soma [182] bei weiterhin beweglicher Zelle [107]. Die Aktivierung der Mikroglia läuft jedoch keineswegs immer identisch, sondern scheint von vielen Faktoren abhängig zu sein. Einfluss nehmen u. a. sowohl die Art des

externen Stimulus als auch dessen Intensität. Je nachdem, welchem Reiz eine Zelle ausgesetzt ist, kann eine Aktivierung zu einem pro- oder antiinflammatorischen Profil und Subtyp der Mikroglia führen [76, 93] und so über die Ausschüttung verschiedener Substanzen sowohl protektive als auch destruierende Effekte auf die direkte Zellumgebung ausgeübt werden [182, 186]. Analog zur Einteilung von Makrophagen [94, 144] wurde infolgedessen zwischen zwei voneinander abzugrenzenden Aktivierungszuständen, namentlich dem M1- und M2-Subtyp, unterschieden [41, 150, 191]. Diese strikte Differenzierung in beide Subtypen wird in der jüngeren Literatur zunehmend diskutiert bzw. hinterfragt, jedoch ungeachtet dessen im Folgenden zur Vollständigkeit aufgeführt.

1.2.2.2.1 M1-Mikroglia

Gemäß der zunächst angenommenen Einteilung komme es im Zuge der sog. „klassischen Aktivierung“ [40, 64] durch Ausbildung des M1-Subtyps [23] u. a. zur Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen [64, 182], Proteasen [23], proinflammatorischen Zytokinen oder Tumornekrosefaktor- α [40, 98, 119]. Zudem führe die Aktivierung zur Expression typischer Oberflächenmarker der M1-Mikroglia wie bspw. CD80, CD86 [172] oder iNOS [117]. Die Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen diene bspw. der Rekrutierung des peripheren Immunsystems, wenngleich es im Zuge dessen auch zu neurotoxischen Effekten auf das Gewebe kommen könne [40, 186, 191, 201]. Aufgrund des mitunter nicht unerheblichen pathologischen Einflusses der Mikroglia auf das ZNS wurde davon ausgegangen, dass demnach unter physiologischen Bedingungen ausreichend strikte Mechanismen zur Regulation der Zellen vorliegen müssen [77, 150, 186]. Störungen dieser Kontrollinstanzen stehen laut Forschung im Verdacht, mit unterschiedlichsten neurologischen Erkrankungen im Zusammenhang zu stehen [186]. Als Hauptakteure in der Reaktion auf neuroinflammatorische Prozesse im ZNS sind Mikroglia bewiesenermaßen sowohl an akuten als auch chronischen [136], neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt, die zwangsläufig mit zentralnervösen und chronischen Entzündungsprozessen einhergehen [63, 112, 191]. Die Beteiligung an Erkrankungen wie Depressionen oder Schizophrenie konnte mittlerweile belegt werden [129]. Eine entscheidende Einflussnahme der Mikroglia im Rahmen von beispielsweise Parkinson-Krankheit [85, 157], der Demenz und Alzheimer-Krankheit [45, 129, 150, 186, 220], der Amyotrophen Lateralsklerose oder aber auch der Multiplen Sklerose [45, 76, 186, 206] sind Bestandteil der aktuellen Forschung. Weiterhin wird sich u. a. aktuell

mit der Rolle der Mikroglia im Rahmen neuropathologischer Erkrankungen nach Infektionen mit SARS-CoV-2 beschäftigt [196].

1.2.2.2 M2-Mikroglia

Proinflammatorischen Vorgängen folgt im Regelfall ein Stadium der Regeneration und Reparatur [40, 191]. Der M2-Subtyp der Mikroglia gehöre demnach zum in der Literatur mitunter als „alternative Aktivierung“ bezeichneten Stadium der Rekonstruktion [23] und Immunsuppression [191]. Zu den Triggern dieses Subtyps würden u. a. verschiedene Interleukine wie IL-4, IL-10 [23, 206] oder IL-13 [87] zählen. Im Zuge der Wiederherstellung der physiologischen Homöostase komme es zur Ausschüttung protektiver [201] und antiinflammatorisch wirksamer Substanzen wie Interleukinen und Wachstumsfaktoren wie bspw. TGF β [40] und IGF-I [191]. Die Aufgaben der M2-Mikroglia wurden u. a. in der Regeneration des Gewebes, der Unterdrückung und dem Eindämmen inflammatorischer Prozesse, der Phagozytose von Zellmaterial [23, 201] sowie der Regeneration von Blutgefäßen nach Traumata [117] festgelegt. Als typische Oberflächenmarker der M2-Zellen wurden u. a. Arginase 1 (Arg1) [115, 191] sowie der Mannose-Rezeptor CD206 [23, 172] erachtet.

1.2.3 Heterogenität und Plastizität der Mikroglia

Die beschriebenen Eigenschaften der Mikroglia zeigen deren immense Bedeutung und zugleich weit gefächerte Funktion für das ZNS auf. Die Aktivierung der Mikroglia und die sich hieraus ergebenden Veränderungen in Bezug auf Phänotyp, Genexpression und Funktion sind bis dato jedoch bei Weitem nicht vollständig erforscht [61]. Die strenge Kategorisierung in „gut und böse“ und die Differenzierung beider Subtypen gilt gemäß aktuellem Forschungsstand wie bereits thematisiert als weitgehend obsolet [39, 148, 161]. Laut Paolicelli et al. sollte die Einteilung der Mikroglia demnach keinem „dichotomen“ Schema folgen, sondern eher als „dynamisches“ Konzept im Zuge der Erkenntnisse der fortlaufenden Forschung angesehen werden [148]. Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher sowie kontext-spezifischer Aktivierungszustände [11, 148] und Subtypen [181, 183] nebeneinander zu existieren scheinen [61, 148, 215], die in Abhängigkeit ihrer Umgebung [39, 183] und des vorausgehenden Stimulus voneinander unterschieden werden können [201]. Paolicelli et al. fassten dies jüngst in ihrer Arbeit zur „Nomenklatur“ der Mikroglia zusammen [148].

Morphologisch und funktionell heterogene Subtypen werden bspw. bedingt durch das Geschlecht sowie die direkten Umgebungsbedingungen der Mikroglia [11]. Weiterhin scheinen Veränderungen der Zellmorphologie unter physiologischen Bedingungen nicht nur infolge einer Aktivierung, sondern auch im Rahmen von Alterungsprozessen und Degeneration aufzutreten. Die Mikroglia des „gealterten ZNS“ zeigen bspw. verkürzte Zellfortsätze mit wenigen Verzweigungen [11]. Bei vergrößertem Zellkörper und zeitgleich verlangsamter Beweglichkeit der Zellausläufer zeichnen sie sich u. a. durch verminderte Phagozytoseraten aus [64]. Sie werden in der Literatur mitunter als „*dystrophic microglia*“ bezeichnet [11, 114]. Unterschiedliche Phänotypen sind damit nicht nur mit verschiedenen Aktivierungszuständen in Verbindung zu bringen. Alterungsprozesse stehen zudem im Verdacht, neben Veränderungen des Phänotyps auch mit Funktionseinschränkungen der Mikroglia einherzugehen und folgend Einfluss auf kognitive Prozesse wie die Gedächtnisleistung einzunehmen. Bisht et al. beschrieben in ihrer Arbeit zudem einen weiteren Mikroglia-Subtyp, der maßgeblich unter pathologischen Bedingungen auftreten soll [20]. Die sog. „*dark microglia*“ erhielten ihren Namen durch dunkel erscheinendes, kondensiertes Zytoplasma [11, 19, 20, 148]. Die äußerst aktiven Zellen zeigen stark verzweigte [11], dünne Zellausläufer und eine zelluläre Hyperaktivität auf. Sie stehen im Verdacht, im Zusammenhang mit weiteren pathophysiologischen Vorgängen wie chronischem Stress, dem Altern oder auch neurodegenerativen Erkrankungen gehäuft aufzutreten [19] und direkten Einfluss auf Umbauprozesse nehmen zu können [20]. Augusto-Oliveira et al. unterschieden in ihrer Arbeit schließlich zwischen zahlreichen Mikroglia-Formen und differenzierten zusätzlich zwischen Subtypen des gesunden ZNS und morphologischen Unterformen unter pathophysiologischen Bedingungen [11]. Gemäß dieser Annahme repräsentieren Mikroglia demnach einen Gliazell-Subtyp von enormer Heterogenität und Plastizität [11] mit einer Vielzahl an Funktionszuständen [114].

1.2.4 Differenzierung der Mikroglia

Ein differenzierteres Verständnis der Mikroglia durch fortlaufende Erforschung bietet das Potenzial, Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden, potenziell pathologischen Prozesse im ZNS ziehen und diese für therapeutische Zwecke nutzen zu können [39]. Um das Wissen über das menschliche ZNS erweitern zu können, gilt es demnach, auch die Mikroglia kontinuierlich weiter zu erforschen [62, 167, 201]. Unter zyto- und histologischen sowie immunhistochemischen Gesichtspunkten ist die essenzielle

Voraussetzung hierfür, die Mikroglia klar von den anderen Zellarten abgrenzen zu können. Wie unter 1.2.1 bereits beschrieben, bediente man sich in der Vergangenheit vor allem struktureller Eigenschaften, mittels derer es möglich war, die unterschiedlichen Zellmorphologien unter Zuhilfenahme spezieller Färbemethoden voneinander abzugrenzen [201]. Heutzutage wird die Expression bestimmter Oberflächenmarker genutzt, um Zellen mittels immunhistochemischer Verfahren spezifisch anfärben und mikroskopisch eindeutig identifizieren zu können [70, 201]. Darüber hinaus können hiermit Aussagen zur Lokalisation und quantitativen Expression getroffen werden [201]. Sowohl die Unterscheidung der Mikroglia von anderen Zelltypen des ZNS als auch die Abgrenzung der ursprünglich angenommenen M1- vom M2-Subtypen erschien damit bereits in der Vergangenheit von Interesse [94]. Eine genaue Differenzierung gegenüber den weiteren ZNS-ständigen Makrophagen und den unter pathologischen Bedingungen von peripher eingewanderten Monozyten stellte sich bislang jedoch aufgrund erheblicher Ähnlichkeiten und dem Fehlen spezifischer Oberflächenmarker problematisch dar [17, 23, 55, 73, 97, 112]. Monozyten, die sich im Verlauf zu Makrophagen differenzieren, lassen sich rein morphologisch nicht mehr von amöboid imponierenden Mikroglia unterscheiden [117]. Abseits des Phänotyps betreffen die weiteren Gemeinsamkeiten insbesondere auch die Expression bestimmter oberflächlicher Markerproteine wie u. a. IBA-1 [11, 73, 94, 201], P2Y₁₂ [201], CD68 [73, 94] oder CX₃CR1 [11, 117]. 2016 gelang es schließlich einen Oberflächenmarker zu identifizieren, der es ermöglicht, Mikroglia spezifisch anzufärben [17, 172]. TMEM119, auch als „*osteoblast induction factor*“ (OBIF) bezeichnet [94], stellt ein Transmembranprotein dar, das auf der Oberfläche von Mikroglia exprimiert wird, jedoch nicht bei weiteren Immun- oder zentralnervösen Zellen nachgewiesen werden konnte [11, 17, 201, 221]. Die genaue Funktion von TMEM119 bleibt bislang unklar [94], das Protein ermöglicht jedoch die spezifische Differenzierung der ZNS-ständigen Mikroglia [201]. TMEM119 zeigt sich bislang als zuverlässiger und stabiler Marker zum immunhistochemischen Nachweis von Mikroglia in allen Aktivierungsstadien [201], wenn auch unter bestimmten Umständen herunterreguliert [217]. In diesem Zusammenhang konnten in jüngster Vergangenheit bereits immunhistochemische Untersuchungen mit TMEM119 am postmortalen Hirngewebe durchgeführt werden, in denen die Reaktion der Mikroglia in Fällen eines nicht-natürlichen Todes sowohl durch Intoxikation [24] als auch durch tödliche Schädel-Hirn-Traumata (SHT) [27] untersucht wurden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch TMEM119 ein Marker etabliert werden konnte, der das Potenzial besitzt, in

weiterführenden Untersuchungen zu Mikroglia im ZNS zu zuverlässigen Ergebnissen führen zu können.

1.3 Der Liquor cerebrospinalis

Ein Teil des menschlichen ZNS wird durch ein Hohlraumsystem gebildet, welches auch als Liquorraum bezeichnet wird. In diesem befinden sich durchschnittlich etwa 150 ml des unter physiologischen Bedingungen klaren Liquor cerebrospinalis (Zerebrospinalflüssigkeit oder „*cerebrospinal fluid*“, CSF) [218]. Der Großteil der CSF wird in Abhängigkeit eines zirkadianen Rhythmus' von spezialisierten Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet [18, 155]. Das Flüssigkeitsvolumen wird pro Tag rund viermal ganzheitlich erneuert [218], zirkuliert fortlaufend und gelangt über spezielle Zugangswege in den Subarachnoidalraum zwischen Arachnoidea und Pia mater [155], der den äußeren Anteil des Liquorraums bildet. Durch die Blut-Liquor-Schranke („*blood-cerebrospinal fluid barrier*“, BCSFB) wird in Ergänzung der BBB des Kapillarendothels eine strikte Trennung vom Blutstrom garantiert, sodass Substanzen lediglich gezielt über die Grenze in oder aus dem ZNS transportiert werden können [200]. Die CSF besteht unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich aus Wasser und beinhaltet ähnlich dem Blutplasma verschiedene Substanzen und Moleküle [218], jedoch annähernd keine zellulären Bestandteile [213]. Sowohl der mechanische Schutz als auch der Auftrieb des Gehirns im Schädel zählen zu den wichtigen Aufgaben der CSF [155]. Aus der engen räumlichen Nähe zum ZNS [26, 103, 142] erschließt sich die Einflussnahme auf unterschiedlichste zentralnervöse Vorgänge und zudem auch die Möglichkeit, über klinische Untersuchungen der CSF Rückschlüsse auf pathologische Veränderungen des Nervensystems ziehen zu können [142, 218]. In der CSF nachweisbare Biomarker können bspw. Aufschluss über zentrale Tumorerkrankungen liefern, die durch eine alleinige Untersuchung des Blutes nicht nachzuweisen sind [103]. Sowohl die BBB als auch die BCSFB können im Rahmen pathologischer Prozesse beschädigt und in Mitleidenschaft gezogen werden [57]. Infolgedessen kann es durch Leckagen oder eine erhöhte Permeabilität zum Übertritt von Substanzen, Zellen und Zellbestandteilen in die CSF kommen [14, 44]. Die Untersuchungen der CSF dienen dabei nicht nur dem Erlangen von Erkenntnissen über pathologische Prozesse, sondern auch dem Erforschen physiologischer Aspekte. In diesem Zusammenhang wird eine weitere physiologische Funktion der CSF diskutiert, deren Grundlage auf dem gänzlichen Fehlen

lymphatischer Abflusswege des ZNS basiert [89, 155]. Im Zuge dessen wird eine direkte Verbindung der CSF zum Hirngewebe über periarterielle Eintrittswege der CSF in den interstitiellen Raum des Neuropils vermutet [74, 89]. Dieser Mechanismus scheint einerseits zur Flüssigkeitshomöostase der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) beizutragen [155]. Andererseits wird beruhend auf einem Zufluss der ISF zur CSF, mitsamt der darin gelösten Stoffwechselprodukte, die Rolle der CSF als eine Art Entsorgungsweg für zentralnervöse Abfallprodukte verdeutlicht. Ähnlich zum Lymphsystem der peripheren Körperanteile wird hiermit die Akkumulation von Abbauprodukten im zentralnervösen Neuropil durch eben jenen fortlaufenden Abtransport durch die CSF verhindert [18, 74, 89, 155]. Beruhend auf der Erkenntnis, dass für den dargestellten Mechanismus auch Astrozyten eine herausragende Rolle spielen, wurde in Anlehnung an das Lymphsystem der Begriff des sog. „*glymphatic pathway*“ etabliert [5, 89]. Funktionsstörungen des *glymphatic pathway* scheinen demnach sowohl mit diversen neurologischen Erkrankungen [18, 92] als auch dem physiologischen Alterungsprozess des ZNS assoziiert zu sein [155].

1.3.1 Klinische Liquordiagnostik

Die Liquordiagnostik unter klinischen Aspekten ist neben der Bildgebung und elektrophysiologischen Verfahren in der heutigen Medizin ein ubiquitär verbreitetes Standardverfahren in der Diagnostik neoplastischer, degenerativer, inflammatorischer sowie infektiöser Erkrankungen des ZNS [53, 199]. Mittels Lumbalpunktion können unterschiedlichste diagnostische Parameter in der CSF gemessen werden. Klassischerweise werden die Zell- und Erythrozytenzahl, Eiweißgehalt und Albuminquotient, Glukose- und Laktatgehalt, intrathekal gebildete Immunglobuline, Antikörper [202] sowie Biomarker [222] erfasst und eine Zelldifferenzierung vorgenommen. Spezifische Verteilungsmuster der einzelnen Indikatoren können im Folgenden nicht nur Verdachtsdiagnosen bestätigen, sondern sowohl differentialdiagnostisch hilfreich sein als auch zum pathogenetischen Verständnis einzelner Erkrankungen beitragen [166]. Der Kern der klinischen CSF-Diagnostik ist die Zytologie. Die sowohl qualitativen als auch quantitativen Analysen der in der CSF enthaltenen Zellen können wertvolle Hinweise auf physio- und pathologische Prozesse im ZNS liefern.

1.3.2 Postmortale Liquordiagnostik

Im Gegensatz zur weit verbreiteten Anwendung der Liquordiagnostik in der klinischen Medizin stellt die postmortale Untersuchung der CSF bis dato lediglich eine Ergänzung zu den makro- sowie mikroskopischen Routineverfahren im Bereich der klassischen forensischen Diagnostik dar. Anwendungsbereiche liegen oft in ergänzenden Untersuchungen zur Feststellung oder zum Ausschluss sog. funktioneller Todesursachen und in Fällen mit plötzlichem Todeseintritt ohne fassbaren makroskopischen Befund während der Autopsie [26, 122]. Die Festlegung einer endgültigen Todesursache gelingt in solchen Fällen meist nur in Kombination aus dem makroskopisch gewonnenen Aspekt der Obduktion und nachfolgenden zusätzlichen Untersuchungen. Hierzu gehören neben histologischen und toxikologischen auch stellenweise immunhistochemische Aufarbeitungen der Asservate [122]. In diesem Zusammenhang erfährt die postmortale CSF zunehmend mehr Aufmerksamkeit als potenzielles postmortales Untersuchungsmedium in sowohl Diagnostik als auch Forschung [24-27, 29, 146, 222]. Von Vorteil ist, dass sich die CSF bedingt durch ihre von äußeren Einflüssen weitestgehend geschützte, anatomische Lage [26] mehrheitlich unbeeinflusst von postmortalen Einflüssen wie autolytischen Prozessen oder Fäulnisvorgängen zeigt [25, 96]. Die Entnahme gestaltet sich im rechtsmedizinischen Alltag zudem unproblematisch durch leichte Erreichbarkeit im Rahmen der Schädelöffnung und simpler Aspiration aus dem Ventrikelsystem bzw. durch subokzipitale Punktion [25]. Wie bereits dargestellt, ermöglicht die exponierte Lage gegenüber dem zentralnervösen Neuropil potenziell indirekten Aufschluss über neuronale Vorgänge sowie pathologische zentralnervöse Prozesse, für die es makroskopisch keinen Anhalt geben muss [29]. Als stabiles Untersuchungssubstrat bietet die CSF damit das Potenzial, die postmortale Routinediagnostik in erweitertem Maße ergänzen zu können [25]. Unterschiedlichste Substanzen, darunter Hormone wie Serotonin [135] oder biochemische Parameter [9] kamen bereits postmortalen Setting zur Anwendung [3, 142, 143, 219, 222, 223]. Weiterhin können Biomarker, bspw. in Form zellulärer, mikrobieller oder struktureller Proteine, als Marker neuropathologischer Prozesse angesehen werden [2, 143, 207, 216, 219, 223, 224]. Die Messung von z. B. S100B wurde klinisch bereits eingesetzt, um das Outcome von Patient:innen mit ischämischen Ereignissen oder auch die Schwere eines SHT besser einschätzen zu können [111, 142]. S100B konnte in Untersuchungen selbst mehrere Tage post mortem in der CSF nachgewiesen werden, wenngleich mit tendenziell höheren Werten als im Vergleich zu klinischen Referenzbereichen [111, 142, 179]. Insbesondere in Bezug auf

das SHT scheint die Forschung im Bereich der postmortalen Liquordiagnostik durchaus verwertbare und wertvolle Erkenntnisse liefern zu können [29, 111, 142, 222, 224]. Auch anhand von Untersuchungen in Fällen vermeintlich tödlicher Intoxikationen durch körperfremde Substanzen konnten bereits vielversprechende Ergebnisse gewonnen werden [24, 193], indem die Analyse der postmortalen CSF die Ergebnisse von standardisierten, toxikologischen Analysen im Blut und anderen Asservaten ergänzen, wenn nicht sogar bestätigen konnten [193]. Zudem ergaben sich Hinweise, dass solche Untersuchungen auch bei bereits fäulnisveränderten Leichen potenziell möglich sein und zur Findung der Todesursache beitragen könnten [147]. Ein weitgehend neues Forschungsgebiet liegt in der Untersuchung der sog. „*metabolomics*“ im Hinblick auf den Einsatz der CSF in der forensischen Diagnostik, den sogenannten „*neuroforensomics*“ [26]. Mit dem Nachweis einzelner niedermolekularer Metabolite in der CSF durch Flüssigchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie (LC/MS) konnten im direkten Vergleich verschiedener Todesursachen differenzierte Verteilungsmuster festgestellt werden. Die Untersuchung der CSF auf diese wiederkehrenden Verteilungsmuster bietet das Potenzial, durch den Nachweis bestimmter endogener Stoffwechselprodukte zur Todesursachenfindung beitragen zu können [26]. Ein weiteres Einsatzgebiet bietet die biochemische Einschätzung des postmortalen Intervalls (PMI), also der Zeit nach Eintritt des Todes bis zur Untersuchung bzw. Obduktion der Verstorbenen [188, 213]. Eine exakte Einschätzung des Todeszeitpunkts ist anhand der verfügbaren Untersuchungsmethoden bis dato nicht möglich. Der Todeseintritt lässt sich anhand konventioneller Verfahren zeitlich lediglich grob einschätzen und kann anhand der zur Verfügung stehenden Parameter ebenfalls nur in einem begrenzten Zeitrahmen erfasst werden [213]. Untersuchungen in diesem Zusammenhang ergaben mit zunehmendem PMI einen erhöhten Proteingehalt [60] sowie eine Pleozytose in postmortal entnommenen CSF-Proben gegenüber klinischen Referenzwerten [154, 213]. Als mögliche Ursachen hierfür sind sowohl vermehrter Zelluntergang nach Todeseintritt als auch eine steigende Permeabilität der BBB in Betracht zu ziehen [60]. Die CSF bietet auch hier weiteres Potenzial für die Ergänzung der postmortalen Diagnostik [188].

Immunhistochemische Verfahren spielen heutzutage nicht nur im Rahmen unterschiedlichster klinischer Fragestellungen eine entscheidende Rolle, sondern kamen ebenfalls bereits im Rahmen unterschiedlichster Fragestellungen am postmortalen Gewebe zum Einsatz [27, 29, 51, 81]. Die immunzytochemische

Aufarbeitung und Analyse der CSF wurde bislang jedoch nicht in die Routine der forensischen Diagnostik integriert [25]. Wie jedoch vorausgehende Untersuchungen bereits zeigen konnten, sollte die CSF als potenziell aussagekräftiges Untersuchungsmedium nicht vernachlässigt werden. Die Immunzytochemie konnte mithilfe von TMEM119 bereits den Nachweis intakter Mikroglia in der postmortalen CSF erbringen. Wie die Zellen in die CSF gelangen und ob ein vitaler oder postmortaler Prozess zugrunde liegt, ob der Übertritt passiv erfolgt oder die Zellen aktiv in den Subarachnoidalraum einwandern und was ihre genaue Funktion darstellen, bleibt bislang noch unbeantwortet.

Unter dem Aspekt der immensen Bedeutung der Mikroglia in Bezug auf das ZNS und der Vorteile, die die CSF mit leichter Erreichbarkeit und hoher Verfügbarkeit im postmortalen Setting vereint, birgt die Kombination aus der Analyse der postmortalen CSF auf Mikroglia unter Zuhilfenahme des Antikörpers TMEM119 anhand etablierter Verfahren der Immunzytochemie ein enormes Potenzial für Untersuchungsmöglichkeiten und Erkenntnisgewinne im Bereich zentralnervöser Prozesse.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der unter dem Abschnitt 1.2 bereits erörterte Forschungsstand zur Mikroglia zeigt deren immense Bedeutung in Bezug auf Prozesse innerhalb des ZNS sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen. Vorausgegangene Untersuchungen erbrachten bereits Hinweise darauf, dass geeignete Analysen postmortalen CSF-Proben die Möglichkeit bieten, Rückschlüsse auf zentralnervöse Vorgänge ziehen zu können. Darüber hinaus konnten erste immunzytochemische Untersuchungen das Vorliegen von Mikroglia in der postmortalen CSF nachweisen. Insbesondere in Zusammenschau mit den vielversprechenden Ergebnissen der postmortalen Liquordiagnostik bieten Untersuchungen der Mikroglia in der postmortalen CSF ein außerordentliches Potenzial bei der Erforschung neuropathologischer Vorgänge. Inwiefern durch Bestimmung der Dichte der Mikroglia Rückschlüsse auf Prozesse innerhalb des Großhirngewebes und den Zustand des ZNS möglich sind, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Weiterhin sollten unterschiedliche Parameter bezüglich ihres Einflusses auf die Zusammensetzung der postmortalen CSF und insbesondere auf die Mikroglia-Profildichte analysiert werden.

Das übergeordnete Ziel der Arbeit war es, das Potenzial der postmortalen CSF als Untersuchungsmedium herauszuarbeiten sowie die Dichte TMEM119-positiver Mikroglia-Profile in der postmortalen CSF zu erfassen und mit den Ergebnissen der Untersuchungen am Hirngewebe zu vergleichen. Grundsätzlich sollte die Bedeutung der postmortalen CSF als Parameter zur Beurteilung neuropathologischer Prozesse herausgearbeitet werden.

2 Material und Methoden

Mithilfe des Mikroglia-spezifischen TMEM119-Antikörpers wurden sowohl immunzytochemische Untersuchungen an postmortal entnommenen CSF-Proben durchgeführt als auch immunhistochemische Färbungen der dazu korrespondierenden Großhirngewebeprobe von insgesamt 60 Fällen systematisch angefertigt. Der spezifische Nachweis von TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofilen wurde zur Dichtebestimmung in beiden Untersuchungsmedien genutzt. Es erfolgte die anschließende Analyse der quantitativen Korrelation der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichten der Zytospin-Präparate der CSF-Proben und den jeweiligen ermittelten Dichten der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in sowohl kortikalen als auch subkortikalen Anteilen der Paraffinschnitte des Großhirns.

2.1 Ethikvotum

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Ethikvotum der Universität Würzburg wird unter dem Aktenzeichen AZ-203/15 geführt.

2.2 Material

2.2.1 Probenasservierung und Erstellung der Fallgruppen

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammten aus postmortal entnommenen Asservaten des Obduktionsgutes des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Würzburg. Berücksichtigt wurden diejenigen Fälle, bei denen im Rahmen der Sektion sowohl die Asservierung von CSF als auch von Großhirngewebe im Zuge eines geringen Verwesungs- oder Verletzungsgrades möglich war. Die zugehörigen Sektionen fanden im Zeitraum von 2018 bis 2019 statt.

Die Gruppeneinteilung in vier Fallgruppen erfolgte anhand der nachweisbaren Dichte an TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofilen auf Grundlage der immunzytochemischen Färbungen der postmortalen CSF-Proben. Weitere Fallparameter wurden hierzu zunächst nicht berücksichtigt. Die jeweiligen Entscheidungsgrenzen zur Zellprofil-Dichte für die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Tabelle 1: Einteilung der Fallgruppen anhand der TMEM119-positiven Zellprofile in der CSF

TMEM119-positive Mikroglia-Profilddichte in den vier einzelnen Fallgruppen mit Angabe der jeweiligen minimalen und maximalen Werte.

Fallgruppe	Mittelwert der quantifizierten Zellprofile
stark positiv	> 30
Positiv	> 10 bis 30
schwach bis negativ	1 bis 10
negativ	0

2.2.2 Parameter

Die vorliegende Arbeit umfasst die Untersuchung von insgesamt 60 Fällen, die sich in vier Fallgruppen zu je 15 Einzelfällen verteilen. Die weitere Datenerhebung erfolgte anhand der im Rahmen der Sektion übermittelten Informationen zur Person, Todesumständen, Todes- bzw. Auffindezeitpunkt sowie der Todesursache laut Todesbescheinigung und prämortalen Lebensumständen (bspw. Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme etc.). Die Datenweitergabe erfolgte über die Ermittlungsakte sowie die bei Sektion anwesenden Sachbearbeiter:innen der jeweils zuständigen Ermittlungsbehörde. Der Umfang der hierbei übermittelten Informationen schwankte fallspezifisch und kann aus diesem Grund nicht für alle Einzelfälle im gleichen Ausmaß vorausgesetzt werden. Des Weiteren wurden in einigen eingeschlossenen Einzelfällen fallspezifisch Alkohol- sowie chemisch-toxikologische Untersuchungen der gewonnenen Asservate in Auftrag gegeben. Hierauf beruhende Untersuchungsergebnisse wurden, sofern vorhanden, in die Datenerhebung aufgenommen.

Folgende Parameter konnten für jeden eingeschlossenen Fall anamnestisch erhoben werden:

- Geschlecht (SEX; w = weiblich, m = männlich)
- Alter (AGE) in Jahren (y)
- PMI in Stunden (h)
- Finale Todesursache
- Gehirngewicht bei Sektion („*brain weight*“, BW) in Gramm (g)
- Reanimationsbehandlung („*cardiopulmonary resuscitation*“, CPR; ja, nein, keine Angabe (k. A.))

2.3 Methoden

2.3.1 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Die verwendeten Labormaterialien zur Durchführung der Färbungen und Hilfsmittel zur anschließenden Analyse der Schnitte und CSF-Zytospins wurden freundlicherweise durch die Abteilung für Neuropathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu sowie das Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Bohnert zur Verfügung gestellt.

2.3.1.1 Verbrauchsstoffe, Chemikalien und Lösungen

Aceton	Pathologisches Institut, Würzburg
Adhäsions-Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Aqua dest.	Pathologisches Institut, Würzburg
Aqua bideest.	Pathologisches Institut, Würzburg
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einmalkanüle	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Eosin	Pathologisches Institut, Würzburg
Ethanol	Pathologisches Institut, Würzburg
Formalin 4%, neutral gepuffert	Pathologisches Institut, Würzburg
Griffstopfen für Reagenzröhrchen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Hämalaun nach Mayer	Pathologisches Institut, Würzburg
Histokitt	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Küvetten	Pathologisches Institut, Würzburg
MultiLink Streptavidin-Peroxidase-Kit	BioGenex Laboratories, Fremont, California, USA
Natriumchlorid (NaCl)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Natronhydroxid (NaOH)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Peroxide Block	Zytomed Systems GmbH, Berlin

Pipettenspitzen	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Protein Block (Goat Serum)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Reagenzröhrchen aus Polypropylen 12 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf SE, Hamburg
Romulin AEC Chromogen Kit	Biocare Medical LLC, Pacheco, California, USA
	1,25 ml Buffer
	8 µl Stabilizer (Solution A)
	8 µl Chromogen (Solution B)
	8 µl Hydrogenperoxids (Solution C)
Salzsäure (HCl)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
TBS-Puffer (pH 7,6)	121,1 g TRIS-Base 169,4 g Natriumchlorid 100 ml 25%ige Salzsäure ad 2000 ml Aqua dest. 100 ml Konzentrat ad 1000 ml Aqua dest.
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
TRIS-Puffer (pH 7,4)	81,0 g NaCl 6 g TRIS-Base ad 1000 ml Aqua dest.
Türks-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylol	Pathologisches Institut, Würzburg
Zentrifugenröhrchen 15ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zitronensäure (pH 6,0)	Pathologisches Institut, Würzburg
	42 g Zitronensäure-1-hydrat 21 g Natriumhydroxid ad 1000 ml Aqua dest.
Zitronensäure-1-hydrat	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Zytochem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin

2.3.1.2 Antikörper

Anti-TMEM119

Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt

2.3.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Canon EOS MKII Kamera

Canon Inc., Tokio, Japan

Canon MP-E65 Objektiv

Canon Inc., Tokio, Japan

Dampfdruckkochtopf

Silit-Werke GmbH & Co. KG, Riedlingen

Entwässerungsautomat

Miles Scientific, Newark, Delaware, USA

Feuchte Kammer

A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Gefrier- und Kühlschrank

Privileg, Bauknecht Hausgeräte GmbH,
Stuttgart

Gewebeeinbettssystem

Miles Scientific, Newark, Delaware, USA

Kochplatte

Rommelsbacher ElektroHausgeräte
GmbH, Dinkelsbühl

Kühlplatte

MEDITE Medical GmbH, Burgdorf

Leica DMC 5400 Digitalkamera

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Leica DM6 B Mikroskop

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Magnetrührer

Labinco BV, Breda, Niederlande

Messpipetten

BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim

pH-Meter

inoLab® Labormessgeräte, WTW, Xylem
Analytics Germany Sales GmbH & Co.
KG, Weilheim

Pipetten

Eppendorf SE, Hamburg

Pipettierhelfer

BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim

Präzisionswaage

KERN & SOHN GmbH, Balingen-
Frommern

Schlittenmikrotom

Leica Biosystems Nussloch GmbH,
Nussloch

Paraffin-Streckbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH,
LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO.
KG, Lauda-Königshofen

Zytospin Zentrifuge

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
Massachusetts, USA

2.3.1.4 Software

GraphPad PRISM

GraphPad Software Inc., San Diego,
California, USA

Leica Application Suite X (LAS X)

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Microsoft 365® Word

Microsoft Corporation, Redmond,
Washington, USA

Microsoft 365® Excel

Microsoft Corporation, Redmond,
Washington, USA

2.3.2 Immunzytochemie

2.3.2.1 Entnahme und Aufbereitung der CSF

Für die Durchführung der immunzytochemischen Färbung der postmortalen CSF wurden Nativpräparate in Form von Zytospins angefertigt. Die CSF wurde hierzu im Rahmen der rechtsmedizinischen Sektion nach Eröffnen der Schädelhöhle durch die Präparatoren mittels einer Einmalkanüle entnommen. Nach Beurteilung der Farbe sowie der Trübheit der Flüssigkeit wurden die Proben zur weiteren Lagerung in Polypropylen-Gefäßen asserviert. Untersuchungen zur Zellzahl sowie zur optimalen Verdünnung der CSF wurden durch das Liquorlabor der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg vorgenommen. Die Zellzahl wurde mittels einer konventionellen Fuchs-Rosenthal-Zellkammer manuell bestimmt. Zu hohe Erythrozytenanzahlen wurden mittels Lyse durch Türks-Lösung (Mischverhältnis Liquor/Türk 1:2) neutralisiert. Um vergleichbare Zellzahlen von 150 Leukozyten/ μl je Probe zu erhalten, wurde, wenn nötig, eine Verdünnung der CSF-Proben mit NaCl 0,9% vorgenommen. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei Raumtemperatur (RT) für 4 min bei 5000 rpm zentrifugiert, auf die Objektträger geschleudert und anschließend luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zytospins bei -23,0 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) gelagert.

2.3.2.2 Durchführung der immunzytochemischen Färbung

Die immunzytochemische Aufarbeitung der CSF-Proben fand in den Räumlichkeiten der Abteilung für Neuropathologie des Institutes für Pathologie der Universität Würzburg statt. Die Einzelschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei RT sowie unter Benutzung einer feuchten Kammer und Mitführen einer Positivkontrolle. Alle Zytospin-Objektträger wurden vor der Färbung beschriftet und der Zellen enthaltende Bereich mittels einer Schablone markiert. Die Färbung erfolgte mittels des ZytoChem-Plus HRP-Polymer-Kits unter Befolgung des mitgelieferten Färbeprotokolls. Als Primärantikörper diente der in **Tabelle 2** aufgeführte Anti-TMEM119-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000, die Verdünnungslösung wurde jeweils vor Beginn der Färbung frisch unter Verwendung des angegebenen Antibody diluent angesetzt und bis zur Verwendung kühl gelagert. Für die Durchführung der Waschschrte wurde ein TRIS-Waschpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 angesetzt und bei RT gelagert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte manuell mittels HCl bzw. NaOH. In dieser Arbeit wurde als Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) verwendet. Die Lösung wurde vor jedem Färbevorgang gemäß Herstellerprotokoll frisch angesetzt und bis zur Verwendung lichtgeschützt bei 4,0 °C gelagert. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die einzelnen Zytospins während des Färbevorgangs, wenn nicht anders angegeben, durchgehend mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm feucht gehalten. Die verwendete Lösungsmenge pro Objektträger betrug je Arbeitsschritt 100 µl. Durch das Abtrocknen überschüssiger Flüssigkeit am Rand der Objektträger im Anschluss der einzelnen Arbeitsschritte wurde eine Verunreinigung und Verdünnung der aufzutragenden Lösungen vermieden.

Tabelle 2: Herstellerinformationen zum Anti-TMEM119-Antikörper

Angaben zur Klonalität, Wirtsspezies, Klassifizierung des Antikörpers sowie Genbeschreibung des verwendeten Antikörpers für die immunzyto- sowie immunhistochemischen Untersuchungen nach Herstellerinformation.

Anti-TMEM119	
Klonalität	Polyklonal
Wirtsspezies	Kaninchen
Antikörperklasse	IgG
Hersteller/Firma	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Genbeschreibung	Transmembran Protein 119

Die einzelnen Schritte des Färbeprotokolls für die immunzytochemische Färbung finden sich im Folgenden zusammengefasst:

1. Aceton (-20,0 °C)	10 min
2. Trockenvorgang	15 min
3. Peroxidblock	5 min
4. Waschen mit Waschpuffer	3 x 5 min
5. Blocking Solution (Proteinblock, Reagent 1)	max. 5 min
6. Waschen mit Waschpuffer	2 min
7. Primärantikörper	60 min
8. Waschen mit Waschpuffer	2 x 5 min
9. Post Block (Reagent 2)	20 min
10. Waschen mit Waschpuffer	3 x 5 min
11. HRP-Polymer (Reagent 3)	30 min
12. Waschen mit Waschpuffer	3 x 2 min
13. AEC	7 min
14. Aqua dest.	Schwenken
15. Hämalan	1 min
16. Bläuen unter Leitungswasser	10 min
17. Ethanol 100%	Schwenken
18. Trockenvorgang	10 min
19. Eindecken	

Zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern wurden diese in einer Küvette mit eisgekühltem Aceton für eine Dauer von 10 min inkubiert. Zur Vorbereitung der weiteren Schritte wurden die Objektträger anschließend für 10 min luftgetrocknet. Durch das Vorhandensein der sogenannten endogenen Peroxidase in allen Hämprotein enthaltenden Zellen (z. B. Erythrozyten mit Pseudoperoxidase und Granulozyten mit Myeloperoxidase) [160] kann es bei Verwendung einer Färbemethode auf Grundlage der HRP („*horseradish peroxidase*“, Meerrettichperoxidase) zu unspezifischen Hintergrundfärbungen kommen [31, 99, 106, 184]. Um diese minimieren zu können, wurde zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität [106] eine Wasserstoffperoxidlösung für 5 min auf die Objektträger aufgetragen. Die Zytospins wurden anschließend in eine Küvette mit Waschpuffer überführt und dort für insgesamt 15 min gewaschen. Zur Minimierung weiterer potenzieller Hintergrundfärbungen durch

unspezifische Protein-Interaktionen wurden die Objektträger im darauffolgenden Arbeitsschritt für 5 min mit der im Kit enthaltenen Blocking Solution (Reagent 1) inkubiert. Um eine Abschwächung der späteren Signalintensität zu vermeiden, wurde sorgsam darauf geachtet, die angegebene Inkubationszeit nicht zu überschreiten. Die Zytospins wurden anschließend für weitere 2 min gewaschen. Nach Auftragen der hergestellten Verdünnungslösung wurden die Präparate anschließend für insgesamt 60 min mit dem Primärantikörper bei 4,0 °C inkubiert. Die Objektträger wurden daraufhin für insgesamt 15 min mit dem im Kit enthaltenen PostBlock (Reagent 2), einem Verstärkungsreagenz, beschichtet und für 20 min inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang im Waschpuffer wurden die Präparate mit dem HRP-Polymer (Reagent 3) für insgesamt 30 min inkubiert. Nach einem Waschvorgang von insgesamt 6 min wurden die Zytospins mit dem ausgewählten Chromogen AEC beschichtet, für 7 min Einwirkzeit lichtgeschützt inkubiert und die enzymatische Reaktion nach Ablauf durch Spülen der Objektträger in Aqua dest. gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung, für die die Zytospins für 1 min in einer Küvette Hämalan belassen und anschließend unter fließendem Leitungswasser für eine Dauer von 10 min gebläut wurden. Die Präparate wurden anschließend einige Male in Ethanol 100% geschwenkt und an der Luft vollständig getrocknet. Das Eindecken mit Deckgläschen erfolgte manuell nach Schwenken der Objektträger in Xylol mittels Histokitt.

2.3.3 Immunhistochemie

2.3.3.1 Entnahme und Aufbereitung des Hirngewebes

Die immunhistochemischen Färbungen fanden an repräsentativen Hirnschnitten derjenigen Fälle statt, zu denen bereits die zugehörigen Untersuchungen der CSF durchgeführt worden waren. Im Rahmen der Sektion erfolgte durch die jeweiligen Obduzent:innen die routinemäßige Entnahme kleiner Referenzgewebeprobe aus dem Frontallappen sowie den parieto-okzipitalen Anteilen des Großhirns bei koronarer Schnittführung. Die einzelnen Organasservate wurden kurz nach Entnahme in einem dem Fall zugeordneten Gefäß mit neutral gepufferter 4%iger Formalinlösung überführt und gelagert. Nach ausreichender Fixierung wurden die asservierten Gewebeanteile entnommen, manuell zurechtgeschnitten sowie in Einbettkassetten gelegt. Alle Parenchymproben wurden sorgfältig ausgewählt und enthielten sowohl Anteile der Hirnrinde als auch des zugehörigen Marklagers. Zur Einbettung wurde das Gewebe in einem Entwässerungsautomaten entwässert, um folgend in das hydrophobe

Paraffinwachs gebettet zu werden. Das formalinfixierte und Paraffin-eingebettete Gewebe (FFPE) [35, 106] wurde nach Entnahme manuell mittels eines Gewebereinbettungssystems in Paraffinblöcke gegossen. Am Mikrotom wurden durch Mitarbeiter der Neuropathologie der Universität Würzburg etwa 6 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Adhäsions-Objektträger aufgezogen. Vor der weiteren Behandlung wurden die Schnitte für etwa 10-20 min auf einer Heizplatte angetrocknet und anschließend für mindestens 24 h bei RT gelagert.

2.3.3.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemische Aufarbeitung der Hirnschnitte fand ebenfalls in den Räumlichkeiten der Abteilung für Neuropathologie des Institutes für Pathologie der Universität Würzburg statt. Für die Färbung der Gewebeproben wurde das MultiLink Streptavidin-Peroxidase-Kit unter Einsatz eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates verwendet. Zur Durchführung wurde ein standardisiertes, manuelles Antikörper-Färbeprotokoll genutzt, das durch die Abteilung der Neuropathologie des Pathologischen Instituts bereitgestellt wurde. Alle Arbeitsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei RT und unter Mitführen einer Positivkontrolle. Die verwendete Antikörperlösung für TMEM119 entsprach in ihrer Herstellung, Lagerung und ihrem Verdünnungsverhältnis dem der immunzytologischen Färbung der CSF. Die Waschschriffe erfolgten, sofern nicht anders angegeben, mittels eines jeweils frisch angesetzten TBS-Puffers mit einem pH-Wert von 7,6. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte analog zur CSF-Behandlung. Die verwendete Zitronensäure wurde auf einen pH-Wert von 6,0 titriert. Als Chromogen wurde ebenfalls AEC eingesetzt, das jeweils manuell angesetzt und fachgerecht gelagert wurde. Um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurde auch bei der immunhistochemischen Färbung mit feuchten Kammern gearbeitet und die Gewebeproben fortlaufend mit Flüssigkeit bedeckt gehalten. Ebenfalls wurde darauf geachtet, alle Schnitte vollständig mit den jeweils verwendeten Lösungen zu bedecken, um ein gleichmäßiges Farbergebnis zu erhalten. Die verwendete Lösungsmenge pro Objektträger betrug je nach Größe der jeweiligen Gewebeprobe etwa 200 µl – 300 µl. Überschüssige Flüssigkeit wurde entlang des Objektträgers und des Geweberandes vorsichtig entfernt, um analog zur Färbung der CSF eine Verdünnung der verwendeten Reagenzien zu vermeiden. In Ergänzung zu der immunhistochemischen Untersuchung der Hirnschnitte wurde zu jeder der 60

Gewebeproben zu Übersichtszwecken ebenfalls eine routinemäßige Kernfärbung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt.

Die einzelnen Schritte des Färbeprotokolls für die immunhistochemische Färbung finden sich im Folgenden zusammengefasst:

1. Xylol	2 x 10 min
2. Ethanol 100%	5 min
3. Ethanol 96%	5 min
4. Ethanol 70%	5 min
5. Aqua dest.	Schwenken
6. Kochen in Zitronensäure	10 min
7. Abkühlen	45 min
8. Aqua dest.	2 min
9. Peroxidblock	15 min
10. Aqua dest.	2 min
11. TBS	2 min
12. Protein Block Ziegenserum 10%	20 min
13. Primärantikörper	über Nacht
14. TBS	2 x 5 min
15. Link-Antikörper	30 min
16. TBS	2 x 5 min
17. Label-Antikörper	30 min
18. TBS	2 x 5 min
19. AEC	7 min
20. Aqua dest.	Schwenken
21. Hämalaun	1 min
22. Bläuen unter Leitungswasser	10 min
23. Eindecken	

Zu Beginn wurden die Objektträger zur Entparaffinierung für insgesamt 20 min in Xylol belassen, anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe von 100% bis 70% geführt sowie abschließend für etwa 5 min in Aqua dest. gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Hirnschnitte mit Zitronensäure bedeckt für 10 min bei etwa 100,0 °C erhitzt und schließlich für 45 min vollständig mit Puffer bedeckt abgekühlt. Analog zur Färbung

der CSF wurden die Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase und zur Vorbeugung unerwünschter Hintergrundfärbungen nach Spülung in Aqua dest. für etwa 2 min in eine Küvette mit einer Lösung aus 250 ml Aqua dest. und 6 ml H₂O₂ überführt und für 15 min abgedeckt inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Spülung für weitere 2 min im TBS-Puffer. Zur Vorbeugung unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers wurde ein Protein Block aufgetragen. Zur Blockierung diente Ziegenserum-Lösung (10 %). Die Proben wurden für 20 min inkubiert, der überschüssige Protein Block wurde nach Ablauf der Zeit abgekippt. Im Anschluss wurde der Primärantikörper TMEM119 auf die Objektträger aufgetragen und die Schnitte anschließend bei 4,0 °C über Nacht lichtgeschützt abgedeckt inkubiert. Zur weiteren Behandlung wurde mit TBS-Puffer der überschüssige Primärantikörper zunächst von den Schnitten entfernt sowie diese für insgesamt 10 min gespült. Im Anschluss wurden die Objektträger mit dem sekundären bzw. Link-Antikörper benetzt und für 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang für 2 min wurde der tertiäre bzw. Label-Antikörper aufgetragen und für weitere 30 min auf den Schnitten belassen. Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung entfernt und die Schnitte erneut für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit dem Chromogen AEC unter einer lichtgeschützten Abdeckung. Nach 7 min wurde die Reaktion durch einen Waschvorgang in Aqua dest. unterbrochen. Analog zur immunzytochemischen Färbung wurden die Hirnschnitte im Anschluss gebläut und eingedeckt.

2.3.4 Auswertung

Mithilfe einer Spiegelreflexkamera wurden mit 1,5-facher Vergrößerung zunächst digitale Übersichtsaufnahmen der hergestellten HE-Färbungen sowie der immunhistochemischen Färbungen der Hirnschnitte erstellt. Diese dienten einer groben, makroskopischen Orientierung über die gesamte Probenschnittfläche. Nach manueller Optimierung der Kontrasteinstellungen wurden die hochauflösenden Bilddateien anschließend in TIF-Dateien konvertiert. Die Herstellung der Spiegelreflexaufnahmen sowie die neuropathologische Beurteilung in Verteilung und Struktur der Mikroglia in den Großhirnpräparaten wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. med. Helmut Heinsen vom Institut für Rechtsmedizin Würzburg übernommen und die Ergebnisse für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Bildanalyse und softwarebasierte Profildichtebestimmung der Mikroglia erfolgten anhand mikroskopischer Bildaufnahmen. Hierzu wurden einzelne digitale Lichtbilder bei 100-facher Vergrößerung mittels einer Leica Digitalkamera und dem zugehörigen Mikroskop aufgenommen. Im Sinne der Repräsentativität wurden pro Fall und damit pro Hirnschnitt jeweils zehn Einzelbilder aufgenommen. Diese gliederten sich in je fünf Einzelaufnahmen der Rindenanteile sowie des Markraums, um nachfolgend beide Kompartimente unabhängig voneinander beurteilen zu können. Die Auswahl der Lokalisation der Lichtbilder erfolgte zufällig in den für den Fall repräsentativen Probenarealen. Ausgeschlossen wurden lediglich Anteile der Hirnschnitte mit Färb- und/oder Schnittartefakten. Jede Einzelaufnahme wies eine Fläche von exakt 1162745,369 μm^2 auf, summiert umfassten die Bilder folglich eine Fläche von jeweils rund 5,8 mm^2 für Hirnrinde und Marklager. Die quantitative Auswertung der Zellprofildichten erfolgte automatisiert mittels des Bildverarbeitungsprogramms Leica LAS X anhand zuvor manuell angepasster Einstellungen der zu erfassenden Parameter bezüglich der Mikroglia-Zellmorphologie. Limitiert wurden dabei sowohl die auszuwertende minimale als auch maximale Größe der Zellstrukturen sowie die Farbtintensität der immunhistochemisch markierten Areale. In die Messungen flossen sowohl die Zellkörper der Mikroglia als auch deren Soma-nahe Zellausläufer mit ein. Die Einstellungen der Softwareparameter wurden für die Auswertung aller Einzelaufnahmen beibehalten und während der fortlaufenden Analyse nicht verändert. Die Ergebnisse wurden im Anschluss durch die LAS X Software in eine Microsoft Excel-Tabelle überführt. Die detektierten Zellprofile wurden als Anzahl der immunpositiven Mikroglia-Profile pro Quadratmillimeter bzw. als Zelldichte pro mm^2 angegeben. Aus den ermittelten Werten der fünf Einzelaufnahmen zu jeweils Rinde und Mark wurden für jeden Fall manuell die entsprechenden Mittelwerte gebildet.

Die Auswertung der CSF-Präparate erfolgte analog zu der der Hirnschnitte. Sowohl die Analyse der Zellprofile durch die Software als auch die Einstellung der zugehörigen Parameter zur Auswertung erfolgten auf gleiche Weise wie die der Gewebeschnitte. Je Zytospin wurden ebenfalls bei 100-facher Vergrößerung insgesamt fünf Einzelaufnahmen erstellt. Die Gesamtfläche der Bilder betrug demnach rund 5,8 mm^2 pro Fall. Zur Orientierung diente wie in **Abbildung 1** dargestellt eine im Uhrzeigersinn festgelegte Reihenfolge der mikroskopisch angefertigten Einzelaufnahmen im Bereich von 12 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr sowie im Zentrum des jeweils kreisrunden Zytospin-Präparates.

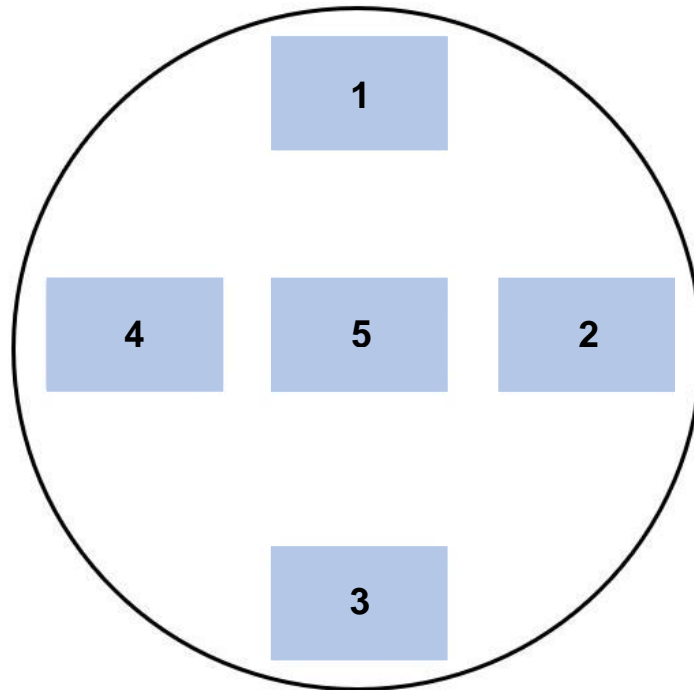


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufnahmelokalisation der fünf einzelnen Lichtbilder pro jeweiligem CSF-Zytospin

Die Grafik dient der Verdeutlichung des Schemas zur Erstellung der Einzelaufnahmen der Zytospin-Präparate bei 100-facher Vergrößerung zur Auswertung mittels Leica LAS X. Die mittels der Zahlenwerte 1, 2, 3, 4 und 5 gekennzeichneten Flächen entsprechen der Lokalisation der fünf Einzelaufnahmen bei 12 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr, 9 Uhr sowie im Zentrum des Zytospins an (Abbildung nicht maßstabsgetreu).

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. med. Benjamin Ondruschka, Direktor des Institutes für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, übernommen und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendungen der GraphPad Prism Software sowie Microsoft Excel. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde ein Shapiro-Wilk-Test angewendet. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde für die parametrischen Daten in Kombination mit dem post hoc erfolgten Tukey-Test durchgeführt. Für nicht-parametrische Daten wurde als Äquivalent zur ANOVA ein Kruskal-Wallis-Test angewendet, post hoc erfolgte die Anwendung eines Dunn-Test. Für die jeweiligen Korrelationen wurden Spearman-Koeffizienten angegeben. Als statistisch signifikant wurden korrigierte p-Werte von 0,05 oder weniger angesehen. [28]

3 Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung des Fallkollektivs

Das untersuchte Fallkollektiv umfasste insgesamt 27 Frauen und 33 Männer. Das Geschlechterverhältnis innerhalb der einzelnen Fallgruppen zeigte sich überwiegend ausgeglichen und ist in **Abbildung 2** graphisch dargestellt.

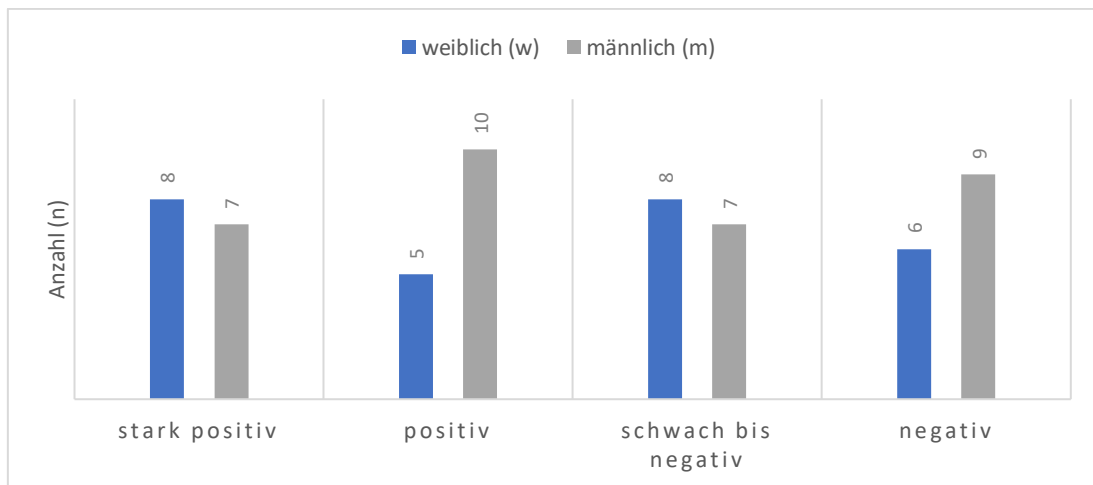


Abbildung 2: Geschlechterverhältnis innerhalb der vier Fallgruppen

Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Anzahl (n) von männlichen (grau) und weiblichen (blau) Verstorbenen innerhalb der einzelnen Fallgruppen an. Gruppe „stark positiv“: w (n= 8), m (n= 7); Gruppe „positiv“: w (n= 5), m (n= 10); Gruppe „schwach bis negativ“: w (n= 8), m (n= 7); Gruppe „negativ“: w (n= 6), m (n= 9).

Das zum Zeitpunkt des Ablebens bestehende Alter der Verstorbenen schwankte zwischen 24 y und 97 y.

Die eingeschlossenen Fälle wiesen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Todesursachen auf (siehe **Tabelle 3**, **Tabelle 4**, **Tabelle 5** und **Tabelle 6**). Zur besseren Übersicht wurden die anhand des Obduktionsberichtes bzw. in Kombination mit den Ergebnissen der chemisch-toxikologischen Untersuchungen final ermittelten Todesursachen in folgende übergeordnete Todesursachenkategorien eingeteilt:

- Herz
- Hypoxie
- Multiorganversagen (MOV)
- Intoxikation
- „traumatic brain injury“ (TBI)
- „isolated thoracic trauma“ (ITT)
- Verbluten
- Autoptisch nicht bestimmbar (hierunter wurden diejenigen Fälle zusammengefasst, bei denen sich sowohl makroskopisch als auch in zusätzlichen chemisch-toxikologischen und/oder histologischen Untersuchungen kein Anhaltspunkt für eine genaue Todesursache ergab).

In **Abbildung 3** lässt sich die Verteilung der einzelnen Sterbefälle des Gesamtkollektivs auf die Kategorien ablesen.

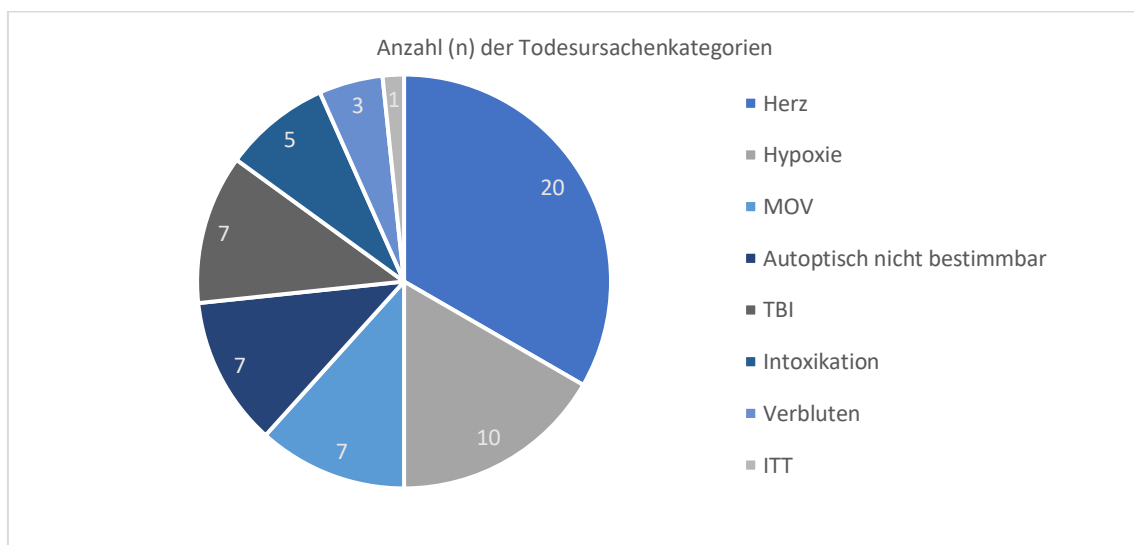


Abbildung 3: Quantitative Verteilung der final festgelegten Todesursachen der einzelnen Sterbefälle in Todesursachenkategorien

Das Kreisdiagramm zeigt die Anzahl der Einzelfälle, die anhand der final festgestellten Todesursachen den jeweiligen übergeordneten Todesursachenkategorien zugeordnet wurden, sowie deren graphischer Anteil am Gesamtkollektiv. In einem Drittel der eingeschlossenen Fälle (n= 20) konnte die finale Todesursache der Kategorie „Herz“ zugeordnet werden. Weitere Verteilung: Hypoxie (n= 10), MOV (n= 7), Autoptisch nicht bestimmbar (n= 7), TBI (n= 7), Intoxikation (n= 5), Verbluten (n= 3), ITT (n= 1).

Das PMI wurde als Zeit zwischen dem laut Todesbescheinigung ersichtlichen Zeitpunkt der Feststellung des Todes bzw. dem Auffindezeitpunkt des Leichnams und Beginn der

Obduktion erfasst und umfasste Werte zwischen 10 h und 713 h. Die errechneten Mittelwerte für das PMI für die einzelnen Fallgruppen sind in **Abbildung 4** ersichtlich.

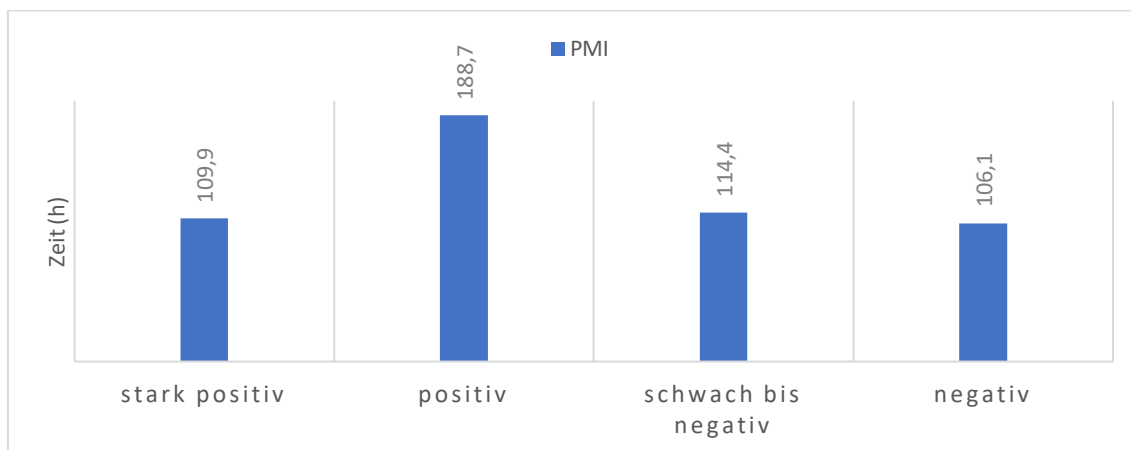


Abbildung 4: Mittelwerte der PMI der einzelnen Fallgruppen

Das Balkendiagramm dient der Darstellung und dem Vergleich der errechneten Mittelwerte der gemessenen PMI (h) innerhalb der einzelnen Fallgruppen: Gruppe „stark positiv“: 109,9 h; Gruppe „positiv“: 188,7 h; Gruppe „schwach bis negativ“: 114,4 h; Gruppe „negativ“: 106,1 h (Ergebnisse auf eine Nachkommastelle gerundet).

Angaben über eine durchgeführte CPR wurden den zur Vorlage gelangten Todesbescheinigungen entnommen oder im Rahmen der Sektion den Obduzent:innen mitgeteilt. In einigen Fällen konnten keine Angaben bezüglich einer stattgehabten CPR gemacht werden. Die Verteilung der Angaben zur CPR sind **Abbildung 5** zu entnehmen.

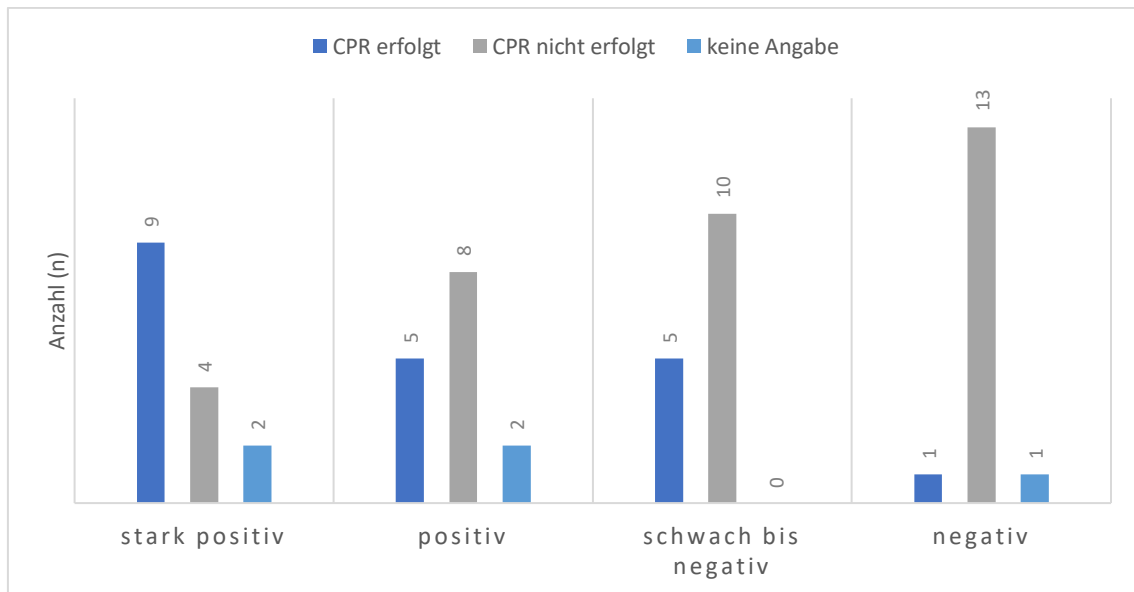


Abbildung 5: Angaben zur CPR der einzelnen Fallgruppen

Das Balkendiagramm zeigt die quantitative Verteilung der Angaben zur CPR im Vergleich zwischen den Fallgruppen, CPR erfolgt (dunkelblau), CPR nicht erfolgt (grau), keine Angabe (hellblau). Gruppe „stark positiv“: CPR erfolgt (n= 9), CPR nicht erfolgt (n= 4), keine Angabe (n= 2); Gruppe „positiv“: CPR erfolgt (n= 5), CPR nicht erfolgt (n= 8), keine Angabe (n= 2); Gruppe „schwach bis negativ“: CPR erfolgt (n= 5), CPR nicht erfolgt (n= 10), keine Angabe (n= 0), Gruppe „negativ“: CPR erfolgt (n= 1), CPR nicht erfolgt (n= 13), keine Angabe (n= 1).

Das BW wurde im Rahmen der Sektion nach Entnahme des Gehirns aus der Schädelhöhle durch die jeweils zuständigen Obduzent:innen erfasst. Das BW umfasste das Gesamtgewicht von Groß- und Kleinhirn mit Hirnstamm. Die erfassten Werte schwankten für das Gesamtkollektiv zwischen 1000 g und 2050 g.

Das gesamte Fallkollektiv mit separater Aufführung der einzelnen Fallgruppen unter Berücksichtigung der erhobenen Parameter findet sich geordnet nach Fallgruppen zusammengefasst in **Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5** sowie **Tabelle 6**.

Tabelle 3: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "stark positiv"

Tabelle modifiziert nach [28]. Angaben zu SEX (w; m), AGE (y), PMI (h), Todesursache, Todesursachenkategorie, CPR (ja; nein; k. A.) und BW (g) zu den eingeschlossenen Einzelfällen der Fallgruppe „stark positiv“.

SEX	AGE	PMI	Todesursache	Kategorie	CPR	BW
w	59	58	Strangulation	Hypoxie	ja	1330
w	84	227	MOV	MOV	nein	1265
m	61	57	Unklar, Verdacht auf Kombination aus akutem Herz- und Atemversagen sowie Epilepsie	Autoptisch nicht bestimmbar	ja	1260
m	50	42	Akutes Herzversagen bei massiv vorgeschädigtem Herz	Herz	ja	1320
w	86	70	Akutes Herzversagen bei massiv vorgeschädigtem Herz, Herzreinfarkt	Herz	ja	1300
w	28	10	Kohlenmonoxidvergiftung	Hypoxie	ja	1605
m	73	95	Spinales Trauma nach Sturz mit Fraktur des zweiten Halswirbelkörpers	TBI	ja	1400
m	68	34	Akutes Herzversagen bei massiv vorgeschädigtem Herz	Herz	nein	1250
m	85	117	Akutes Herzversagen bei massiv vorgeschädigtem Herz	Herz	nein	1535
m	47	105	Unklar, a. e. akutes Herzversagen	Autoptisch nicht bestimmbar	ja	1425
w	74	208	Polytrauma mit Einriss des Herzens unter Ausbildung eines Hämatothorax	ITT	ja	1265
m	24	142	Unklar	Autoptisch nicht bestimmbar	nein	1500
w	72	106	Ersticken nach Aspiration von Mageninhalt	Hypoxie	ja	1215
w	48	83	MOV bei Sepsis	MOV	k. A.	1390
w	66	294	MOV bei Sepsis bei Druckgeschwüren der Steißbeinregion	MOV	k. A.	1270

Tabelle 4: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "positiv"

Tabelle modifiziert nach [28]. Angaben zu SEX (w; m), AGE (y), PMI (h), Todesursache, Todesursachenkategorie, CPR (ja; nein; k. A.) und BW (g) zu den eingeschlossenen Einzelfällen der Fallgruppe „positiv“.

SEX	AGE	PMI	Todesursache	Kategorie	CPR	BW
w	81	153	Akutes Herzversagen bei Lungenfibrose und Herzmuskelmassenzunahme	Herz	nein	1280
m	55	90	Ersticken bei Aspiration von Mageninhalt	Hypoxie	ja	1450
m	33	143	Unklar	Autoptisch nicht bestimmbar	nein	1220
m	89	312	Atypisches Erhängen	Hypoxie	nein	1575
m	50	105	Herzdrucklähmung bei Einriss der Körperhauptschlagader im Brustbereich	Herz	nein	1380
m	59	72	Intoxikation mit Oxycodon, Clomethiazol und Alkohol	Intoxikation	nein	1405
m	60	136	Verbluten nach Innen bei Leberzerreiung	Verbluten	ja	1530
m	82	135	Plötzlicher Herztod bei massiver, krankhafter Herzvorschdigung	Herz	ja	1420
w	58	93	Herzinfarkt	Herz	ja	1610
w	77	713	Kombination aus akutem Herz- und Nierenversagen bei Sepsis und Zustand nach (Z. n.) Dekubitus Grad IV	MOV	k. A.	1480
m	57	466	Herzbeutelamponade bei Herzdurchschuss	Herz	nein	1820
w	27	35	Hirntod infolge eines generalisierten Sauerstoffmangels nach Angriff gegen den Hals mit Würgen und zahlreichen Einstichen	Hypoxie	ja	1570
w	87	71	Kombination aus akutem Atem- und Herzversagen bei vorgeschädigten Organen	MOV	k. A.	1240
m	80	184	Ertrinken	Hypoxie	nein	1530
m	55	122	Herzrhythmusstörungen	Herz	nein	1350

Tabelle 5: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "schwach bis negativ"

Tabelle modifiziert nach [28]. Angaben zu SEX (w; m), AGE (y), PMI (h), Todesursache, Todesursachenkategorie, CPR (ja; nein; k. A.) und BW (g) zu den eingeschlossenen Einzelfällen der Fallgruppe „schwach bis negativ“.

SEX	AGE	PMI	Todesursache	Kategorie	CPR	BW
m	33	59	Akutes Herzversagen bei Herzinfarkt	Herz	ja	1640
w	86	132	Akutes Herzversagen bei Herzinfarkt	Herz	nein	1180
m	85	150	MOV nach Rumpfrauma und SHT	MOV	nein	1405
w	80	75	Eitrige Entzündung der Atemwege/ eitrige Bronchitis	Hypoxie	nein	1370
w	78	81	Akutes Herzversagen bei koronarer Herzerkrankung	Herz	nein	1000
m	39	120	Intoxikation durch Codein, Methadon und Diazepam	Intoxikation	nein	1490
w	95	98	A. e. akutes Herzversagen bei Herzvorschädigung	Herz	nein	1050
m	73	157	Verbluten bei Magenbluten	Verbluten	nein	1130
w	42	269	Intoxikation mit Olanzapin	Intoxikation	ja	1230
m	37	105	Unklar	Autoptisch nicht bestimmbar	ja	1470
m	59	68	Unklar, ggf. Stoffwechsellentgleisung im Sinne eines Alkoholentzugsdelirs	Autoptisch nicht bestimmbar	ja	1565
w	35	165	Intoxikation mit Diphenhydramin und Alkohol	Intoxikation	nein	1245
w	89	89	Akutes Herzversagen bei vorgeschädigtem Herz	Herz	nein	1280
m	88	93	Zentrales Regulationsversagen (ZRV) bei SHT	TBI	nein	1180
w	63	55	Verbluten nach Innen nach rupturiertem Aneurysma	Verbluten	ja	1430

Tabelle 6: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "negativ"

Tabelle modifiziert nach [28]. Angaben zu SEX (w; m), AGE (y), PMI (h), Todesursache, Todesursachenkategorie, CPR (ja; nein; k. A.) und BW (g) zu den eingeschlossenen Einzelfällen der Fallgruppe „negativ“.

SEX	AGE	PMI	Todesursache	Kategorie	CPR	BW
m	30	130	Polytrauma nach Verkehrsunfall mit Schädelbasisbruch	TBI	nein	1550
w	48	106	Unklar, a. e. Kombination aus ZRV und Unterkühlung	Autoptisch nicht bestimmbar	nein	1190
w	97	216	Erhängen	Hypoxie	nein	1165
w	76	105	Kombination aus ZRV und akutem Herzversagen bei Verdacht auf Sepsis bei Dekubitus Grad 4	MOV	k. A.	1365
w	49	119	Akutes Herzversagen bei deutlich vorgeschädigtem Herz	Herz	nein	1420
w	80	123	ZRV bei Subduralblutung und Hirnmassenblutung	TBI	nein	1235
w	91	125	ZRV mit massiver Subduralblutung nach Sturz auf den Hinterkopf	TBI	nein	1180
m	66	185	ZRV bei SHT	TBI	nein	1380
m	82	36	ZRV nach traumatisch bedingtem Subduralhämatom nach Sturz	TBI	nein	1310
m	90	132	Akutes Herzversagen bei deutlich vorgeschädigtem Herz	Herz	nein	1265
m	55	96	Akutes Herzversagen bei vorgeschädigtem Herz mit Herzmuskelmassenzunahme	Herz	nein	2050
m	53	72	Ertrinken	Hypoxie	nein	1500
m	62	61	Akutes Herzversagen	Herz	ja	1510
m	91	45	Akutes Herzversagen bei Herzinfarkt	Herz	nein	1200
m	25	40	Intoxikation mit Heroin in Kombination mit Alkoholisierung	Intoxikation	nein	1520

3.2 Morphologie und Verteilung der Mikroglia

In allen Präparaten wurde nach Durchführung der Färbungen an beiden Untersuchungsmedien die Quantifizierung der vorhandenen Mikroglia durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Gewebe- und CSF-Proben zunächst hinsichtlich der Verteilung der Zellprofile und der vorgefundenen strukturellen Zellkonformitäten beurteilt. Immuno-positive, durch AEC rötlich angefärbte Areale konnten sowohl in den Schnitten als auch den CSF-Zytospins identifiziert und als Mikroglia-Profile interpretiert werden. Hinsichtlich der Morphologie und Verteilung ergaben sich teils deutliche Unterschiede.

3.2.1 Mikroglia im Kortex und der weißen Substanz

Die Analyse der morphologischen Eigenschaften der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in den untersuchten Paraffinschnitten der Großhirngewebeproben erfolgte jeweils anhand der angefertigten Übersichtsaufnahmen. Exemplarische Abbildungen zweier Beispielfälle finden sich in **Abbildung 6 (a)** und **(d)**. Mittels hochauflösender RAW- bzw. JPEG-Dateien wurden innerhalb der Hirnschnitte bei zunächst geringer Vergrößerung die Verteilung der immuno-positiven Areale im gesamten Präparat beurteilt. Bei maximal achtfacher Vergrößerung der Übersichtsaufnahmen konnten TMEM119-positive Mikroglia abschnittsweise in Form intensiv angefärbter, runder Zellprofile identifiziert werden. Die Differenzierung und Beurteilung der feinen Zellausläufer innerhalb der Paraffinschnitte hingegen gelang erst anhand mikroskopischer Lichtbildaufnahmen des Gewebes bei 100-facher Vergrößerung (siehe **Abbildung 6 (b), (c), (e)** und **(f)**). Die Paraffinschnitte zeigten gemäß Entnahmelokalisation der Gewebeasservate unterschiedliche kortikale Bereiche mit jeweils variabler neuronaler Zelldichte und lediglich abschnittsweise erkennbarer Laminierung der sechs Schichten des Isokortex. Eine Differenzierung von prä- und postzentralem Rindengewebe gelang insbesondere bei Identifikation der Grenze zwischen der supragranulären Lamina IIIc (Lamina pyramidalis externa) und der infragranulären Lamina V (Lamina pyramidalis interna).

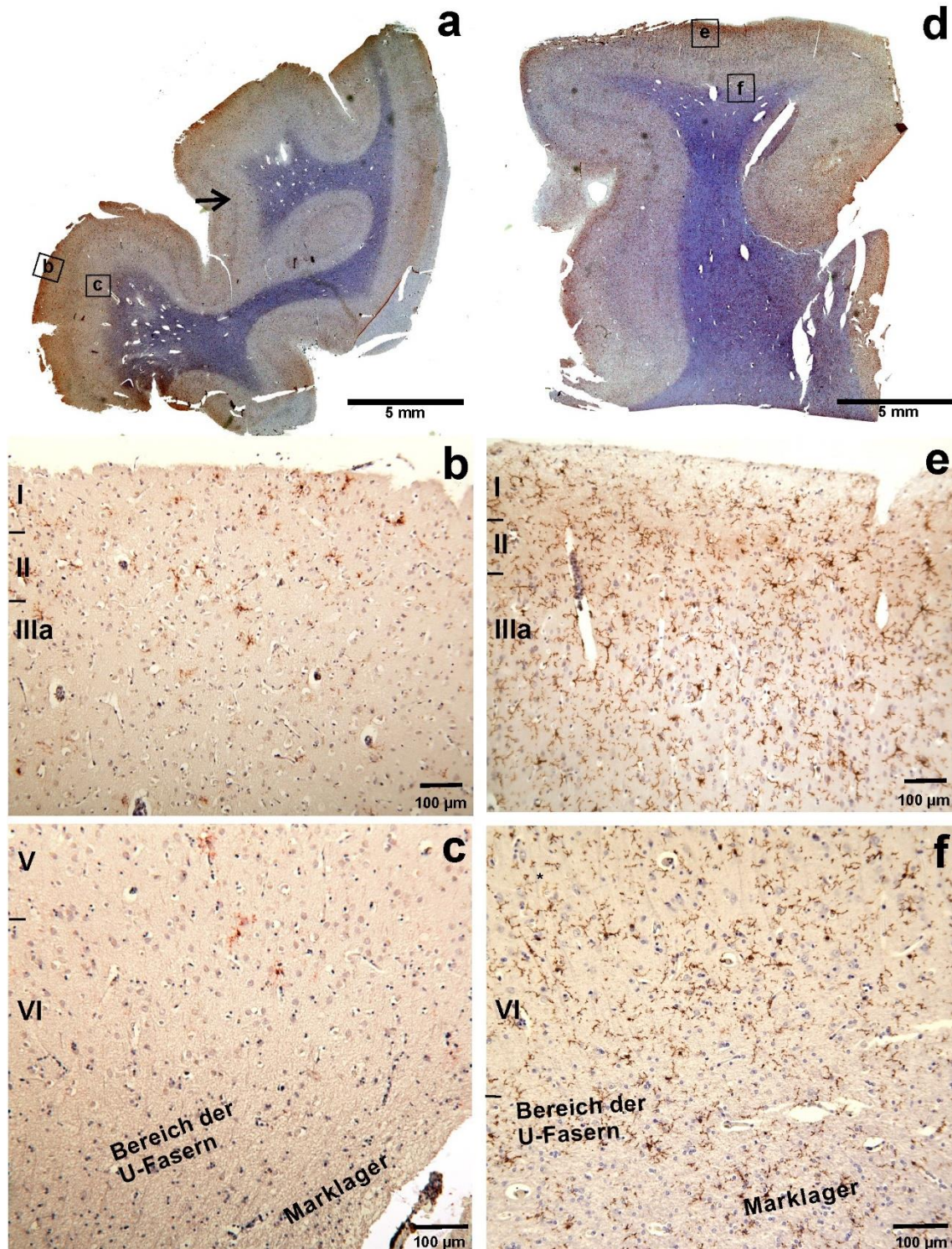


Abbildung 6: Aufnahmen von Paraffinschnitten des Isokortex zweier exemplarischer Fälle nach immunhistochemischer Färbung mit TMEM119 unter Vergrößerung

Übersichtsaufnahmen (a) und (d) von Anteilen des Isokortex des Parietallappens in Frontalebene, Vergrößerungen einzelner Anteile in (b), (c), (e) und (f), Maßstab jeweils wie angegeben. Perivaskuläre Erweiterungen im Bereich des Markraums beider Paraffinschnitte (Status cribrosus) sowie Abnahme der immunhistochemischen Färbung im perivaskulären Bereich. (a) Fall der Gruppe „negativ“: 91 Jahre alte Frau mit sturzbedingter Subduralblutung (TBI); PMI = 125 h. Immunhistochemisch gefärbte Anteile insbesondere im Bereich der Gyri, weniger bis gar keine TMEM119-positiven Areale in den Wänden und dem Furchengrund. Charakteristisch stark ausgeprägte, gut sichtbare innere Körnerzellschicht (Lamina

IV bzw. Lamina granularis interna des parieto-okzipitalen Kortex (**Pfeil**). Ungleichmäßige immunhistochemische Anfärbung insbesondere in den rechten sowie unteren Schnittanteilen. **(b)** Hirnoberflächennahe Anteile des Kortex mit supragranulärer Schichtung mit Abbildung von Laminae I bis IIIa. Diffus gefärbtes Neuropil mit lediglich vereinzelten TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen und feinen Zellfortsätzen. Die Zellausläufer mehrheitlich unscharf abgrenzbar. **(c)** Marknahe, tiefe Schichten des Kortex mit Laminae V und VI (Lamina multiformis) mit Anschnitt der U-Fasern und der weißen Substanz. Einzelne immuno-positiv Mikroglia-Profile, lediglich unscharfe Zellausläufer. **(d)** Fall der Gruppe „stark positiv“: 28 Jahre alte Frau mit Hypoxie-bedingtem Todeseintritt bei Kohlenmonoxidvergiftung; PMI = 10 h. **(e)** Supragranuläre Laminae I bis III, intensive Neuropilfärbung mit Vielzahl TMEM119-positiver Mikroglia-Profile und zahlreichen Zellfortsätzen. Besonders erhöhte Profildichte am Übergang von Lamina II (Lamina granularis externa) zu Lamina I (Lamina molecularis) unter Verlust der Zellfortsätze im Bereich der inneren Lamina I. Äußere Anteile der Lamina molecularis mit Mikroglia-Profilen mit wenigen bis keinen Ausläufern, angeordnet in Richtung Hirnoberfläche. **(f)** Laminae V und VI (Lamina multiformis) mit Anschnitt von U-Fasern und Marklager. Analog zu supragranulären Schichten zahlreiche Zellfortsatz-reiche TMEM119-positiv Mikroglia-Profile. Abbildung modifiziert nach [28].

Der immunhistochemische Nachweis von TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofilen im Hirngewebe gelang in allen eingeschlossenen Einzelfällen. Alle Gewebeproben zeigten immuno-positiv Zellen mit einer allgemeinen Proliferation der Mikrogliazellen. In einigen Fällen konnte insbesondere in den peripheren Anteilen der Schnitte eine ungleichmäßige Färbung nach Immunhistochemie festgestellt werden (siehe **Abbildung 6 (a)**). Das untersuchte Gewebe zeigte sich durchsetzt von runden, als Zellkörper zu identifizierenden Anteilen der Mikroglia mit abschnittsweise feinen Fortsätzen in Sinne sternförmiger Zellprofile. Einige Gewebsabschnitte zeigten sich hingegen lediglich dicht mit Zellausläufern durchsetzt. Hinsichtlich der Verteilung und Dichte der Mikroglia-Profile konnten sowohl zwischen den Fallgruppen, den einzelnen analysierten Fällen als auch innerhalb einzelner Paraffinschnitt-Areale teils markante Unterschiede festgestellt werden. Die angefärbten Glia-Profile zeigten mitunter keine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Schichtanteile des Großhirnkortex, sondern formten abschnittsweise Zellansammlungen in Arealen mit resultierend hoher Zellprofildichte (siehe **Abbildung 6 (b), (c), (e) und (f)**). Während Paraffin-Schnitte der Fallgruppe „negativ“ sich allgemein durch ein kortikale diffuse Färbung des Neuropils und einer eher geringen Dichte an TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen auszeichneten (siehe **Abbildung 6 (b) und (c)**), konnten in Einzelfällen mit ebenfalls geringer Profildichte von maximal 100 Zellprofilen in der Hirnrinde ein abschnittsweise laminär imponierendes Verteilungsmuster der TMEM119-positiven Mikroglia mit Konzentration auf die Schichten der äußeren kortikalen Lamina II und Lamina III festgestellt werden. Gewebeproben der Fallgruppe „positiv“ wiesen in Übersichts- und Detailaufnahmen intensiver gefärbte Anteile des Neuropils auf (siehe **Abbildung 6 (d) und (e)**). Bei steigender Dichte der als TMEM119-positiv zu identifizierenden Mikroglia-Zellprofilen ergab sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der intensiveren Neuropilfärbung in den

Übersichtsaufnahmen und der ebenfalls erkennbaren erhöhten Dichte an schmalen, immuno-positiven Zellfortsätzen. Die Zellausläufer der Mikroglia-Profilen zeigten sich stellenweise unscharf definiert (siehe **Abbildung 6 (b), (c), (e) und (f)**). Auch in den inneren Schichten des Kortex zeigten sich Areale mit erhöhter Dichte an immuno-positiven Mikroglia-Profilen. Eine höhere Glia-Dichte fanden sich demnach in den kortikalen Laminae IIIb und IIIc sowie insbesondere in den marknahen Schichten der Laminae V und VI. Diese bildeten zusammen mit den sog. U-Fasern an der Grenze zum zentralen Markstrahl der weißen Substanz ein weiteres Areal mit außergewöhnlich hoher TMEM119-positiver Mikroglia-Dichte (siehe **Abbildung 6 (f)**).

Auch in der weißen Substanz konnte kein homogenes Verteilungsmuster der immuno-positiven Zellprofile differenziert werden. Sowohl in den tiefer liegenden, zentralen Markanteilen der Gyri sowie im Bereich des Centrum semiovale konnten starke Unterschiede in Verteilung und Dichte der TMEM119-positiven Glia-Profilen festgestellt werden. Neben weitläufigen Arealen mit geringer Profildichte fanden sich wiederum Markanteile mit im Gegensatz hierzu deutlich höherer Dichte an immuno-positiven Mikroglia-Profilen. Weiterhin zeigten sich Bereiche innerhalb der weißen Substanz, die sich durch durchweg eng aneinandergereihte Glia-Profilen mit entsprechend hoher Dichte an TMEM119-positiven Profilen auszeichneten (siehe **Abbildung 6 (a) und (d)**).

Eine der größten Besonderheiten hinsichtlich Verteilung und Struktur der Zellen konnte jedoch insbesondere am Übergang von Lamina II zu den tiefen Anteilen der Lamina I festgestellt werden. Hier ließ sich ein spezielles Verteilungsmuster der Zellprofile abgrenzen: Die Zellen zeigten sich sowohl in Form einzelner Mikroglia-Profilen als auch zu Gruppen angeordnet. Im Gegensatz zu anderen Hirnarealen wiesen die immuno-positiven Zellprofile in diesem Bereich eine strukturelle Veränderung ihrer Zellmorphologie auf. Es zeigten sich zahlreiche eher rundlich konfigurierte Somata der Mikroglia mit augenscheinlichem Verlust ihrer Zellfortsätze. Unter Abstoßung der Zellausläufer schienen diese Zellprofile letztlich in den schwammartig veränderten, oberflächlichen Anteil der Lamina I des Kortex überzugehen (siehe **Abbildung 6 (e)**). Einzelne Mikroglia-Profilen konnten demnach insbesondere in Form Zellfortsatz-armer Somata in den subpialen Gewebeanteilen des Kortex festgestellt werden (siehe **Abbildung 7 und Abbildung 8 (dicker Pfeil)**).

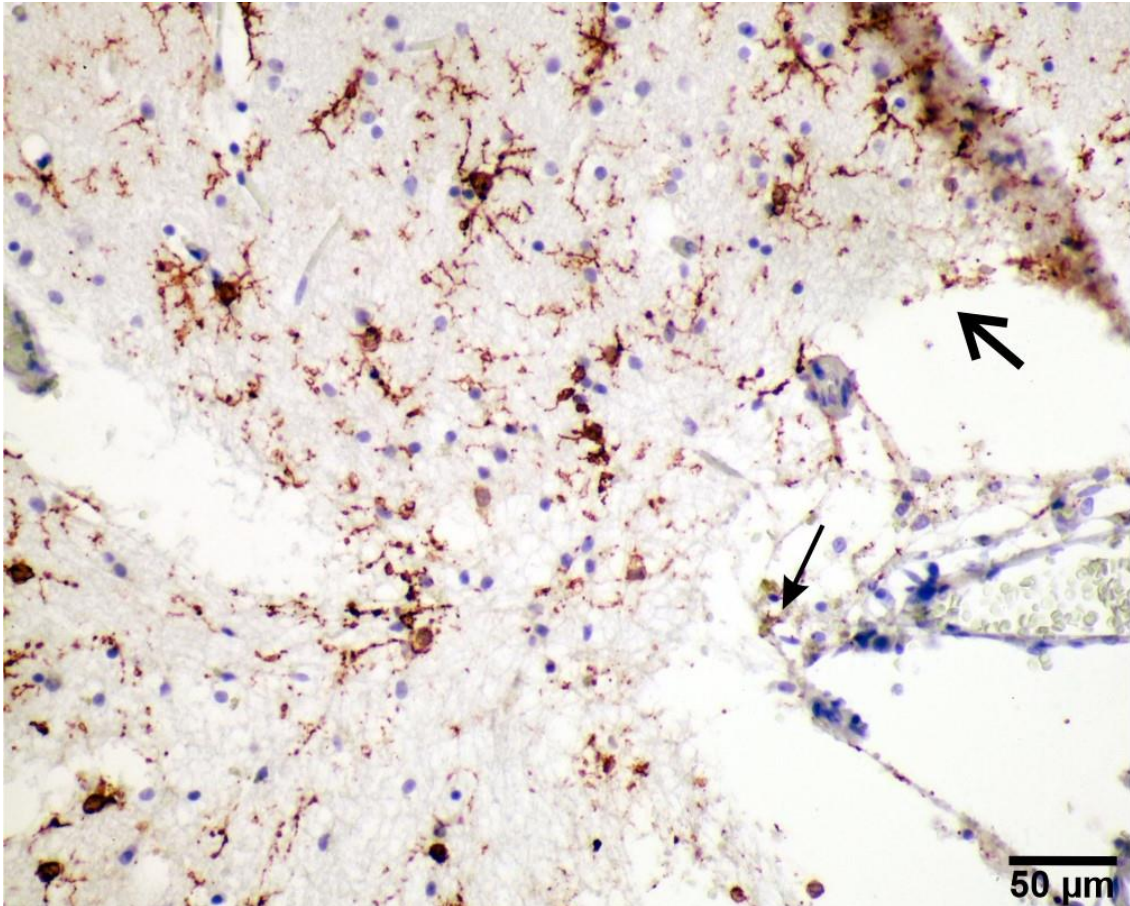


Abbildung 7: Aufnahme der äußeren Kortexanteile (Lamina I) mit Subarachnoidalraum unter Vergrößerung

Ausschnitt des Großhirnkortex mit oberflächlicher Schicht und Anteilen der Pia mater, Maßstab wie angegeben. Fall der Gruppe „stark positiv“: 72 Jahre alte Frau mit Ersticken nach Aspiration von Mageninhalt (Hypoxie); PMI = 106 h. Lamina I (nahe des Furchengrundes) mit squamös und ödematös aufgelockertem Hirngewebe in den zur Hirnoberfläche gewandten Anteilen, darin gruppiert angeordnete Mikroglia-Zellprofile neben einzelnen Fragmenten von Zellfortsätzen. Von der Großhirnoberfläche abgelöste Pia mater mit Übertritt der Mikroglia sowie der Fortsatzfragmente in den subarachnoidalen Liquorraum (**dicker Pfeil**). Stellenweise Zellkontakt mit der Arachnoidea (**dünner Pfeil**). Abbildung modifiziert nach [28].

In einigen Fällen mit Ablösung der Pia mater von der Hirnoberfläche konnten darüber hinaus ebenfalls immuno-positive Mikroglia-Profile in den suprapialen Anteilen nachgewiesen werden. Mikroglia-Profile zeigten sich nach augenscheinlichem Übertritt weiterhin in den unter physiologischen Bedingungen mit CSF gefüllten Subarachnoidalraum (siehe **Abbildung 7**), abschnittsweise mit Kontakt zu den arachnoidalen Hirnhautanteilen (siehe **Abbildung 7 (dünner Pfeil)**).

Lediglich einzelne Paraffinschnitte wiesen Anteile der Hirnrindenoberfläche mit noch anliegender Pia mater auf, die zuvor weder durch Zuschnitt der Proben noch durch

Fixierungs- und Färbeprozesse abgelöst worden war. Auch hier konnten insbesondere in den oberflächennahen Kortexanteilen TMEM119-positive Mikroglia-Profile unter Verlust ihrer Zellfortsätze nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8 (dicker Pfeil)**). Ebenso konnte der Nachweis runder, Fortsatz-armer Mikroglia-Profile beim Durchtritt durch die intakte Pia mater nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8 (dünne Pfeile)**). Einzelne immuno-positive Zellen fanden sich ebenfalls in direkter Umgebung im subarachnoidalen Raum (siehe **Abbildung 8 (dünne Pfeile)**).

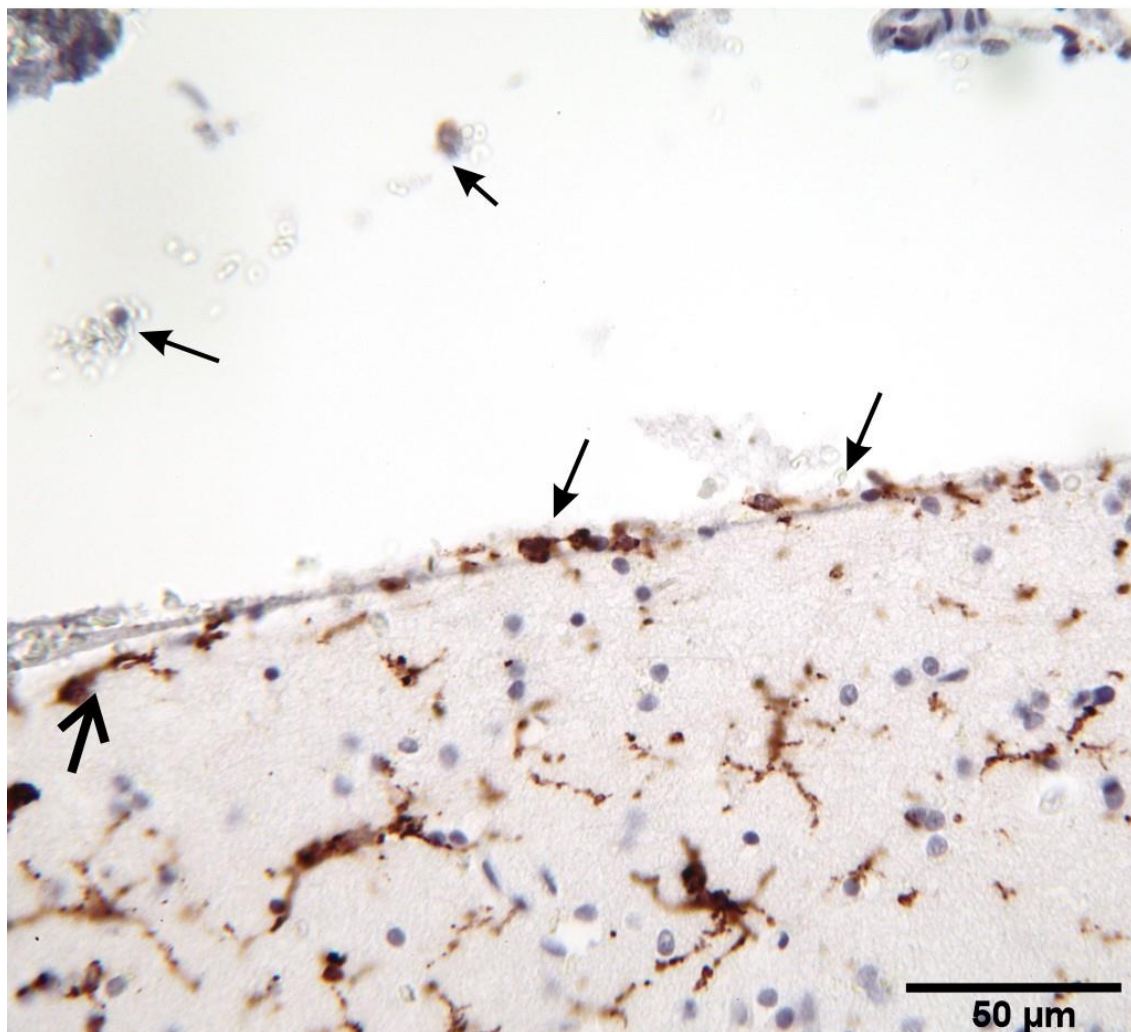


Abbildung 8: Aufnahme der äußeren Kortexanteile mit Pia mater unter Vergrößerung

Ausschnitt des Großhirnkortex mit oberflächlicher Schicht und anliegender Pia mater, Maßstab wie angegeben. Fall der Gruppe „stark positiv“: 48 Jahre alte Frau mit MOV bei Sepsis; PMI = 83 h. TMEM119-positive Mikroglia sowie Fragmente der Zellfortsätze, stellenweise sternförmig verzweigte Zellen mit Ausläufern. Subpial runde, Zellausläufer-arme Mikroglia-Profile am Übergang zur Hirnoberfläche und Pia mater (**dicker Pfeil**). Einzelne immuno-positive, runde Gliazellen beim Durchtritt durch die Pia in den Subarachnoidalraum und die CSF (**dünne Pfeile**). Abbildung modifiziert nach [28].

3.2.2 Assoziation der Mikroglia zum vaskulären System

Bei Durchsicht der Paraffin-Schnitte zeigten sich Anschnitte von sowohl arteriellen als auch venösen Anteilen des Gefäßsystems vorwiegend im Bereich der weißen Substanz (siehe **Abbildung 9**). Diese wiesen unterschiedliche Gefäßkaliber auf, wenngleich Anschnitte großer Gefäße nur selten im gesamten Parenchym festgestellt werden konnten.

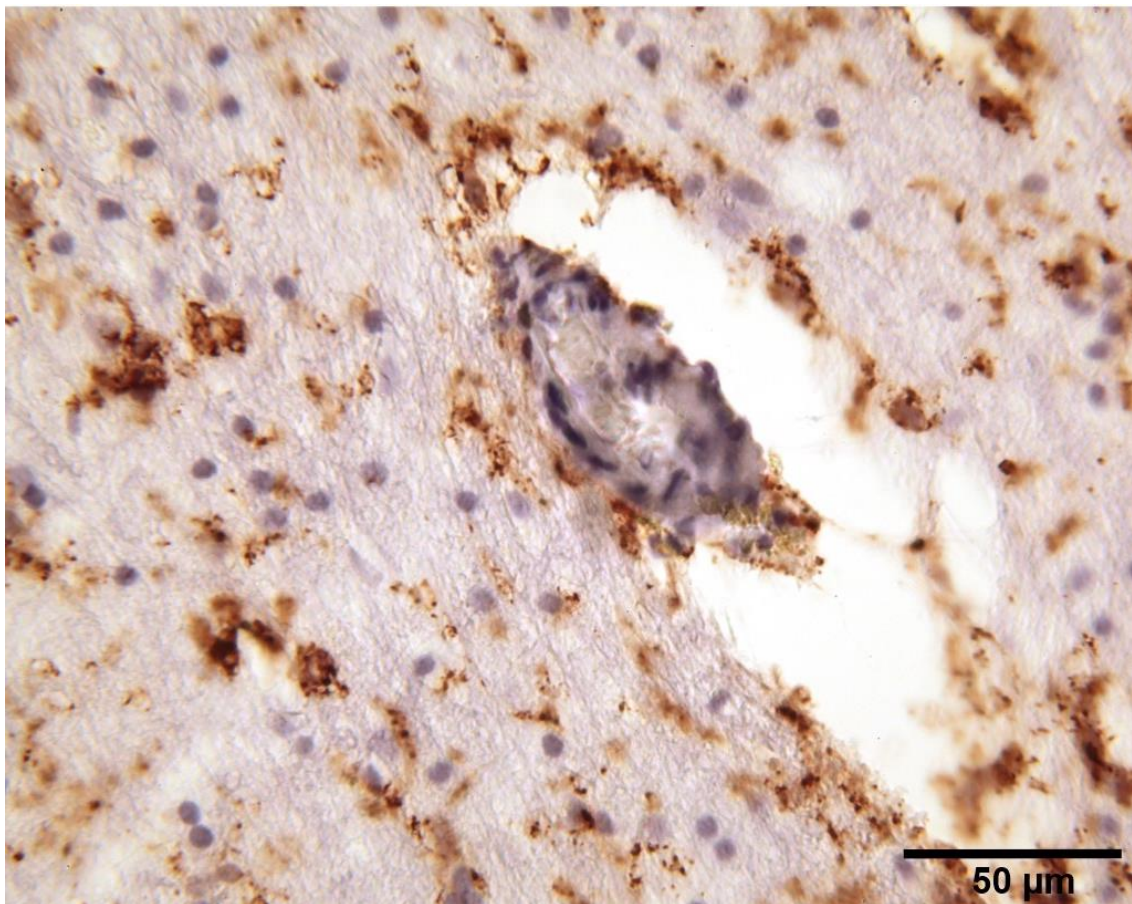


Abbildung 9: Aufnahme des Marklagers mit tangentialem Anschnitt eines Gefäßes und umliegender Mikroglia unter Vergrößerung

Subkortikal gelegene Anteile des Marklagers des Großhirnpräparates mit tangentialem Gefäßanschnitt, Maßstab wie angegeben. Fall der Gruppe „stark positiv“: 48 Jahre alte Frau mit MOV bei Sepsis (siehe **Abbildung 8**); PMI = 83 h. Massive Gewebeschrumpfung als Färbeartefakt mit Gewebe-freiem Spalt in unmittelbarer Umgebung des Gefäßes. TMEM119-positive Mikroglia-Profile in unmittelbarer Nähe zur Adventitia der Gefäßwand. Unklare Assoziation der Mikroglia zur Gefäßwand bedingt durch Schrumpfungsertefakt. Abbildung modifiziert nach [28].

TMEM119-positive Mikroglia-Profile konnten zahlreich in der unmittelbaren Umgebung und in enger topographischer Beziehung zu den Gefäßen des Markraums identifiziert werden, was auf einen gewebsspezifischen Zusammenhang des perivaskulären

Verteilungsmusters der Zellen schließen ließ. Darüber hinaus konnten ebenfalls strukturelle Unterschiede im phänotypischen Erscheinungsbild der immuno-positiven Mikroglia-Profile in Bezug zum Gefäßsystem festgestellt werden. Zellprofile, die in direkter Umgebung oder innerhalb des perivaskulären Raumes identifiziert werden konnten (siehe **Abbildung 9**), wiesen lediglich auffallend wenige Zellausläufer auf und unterschieden sich somit von meist Zellfortsatz-reichen Mikroglia-Profilen in Neuropilanteilen mit größerer Entfernung zu den Gefäßen. Es zeigte sich ein Bild ähnlich dem Verteilungsmuster der Mikroglia-Profile an der Grenze zwischen Lamina I und II des Kortex mit ebenfalls abnehmender Zellfortsatzdichte der Mikroglia in Richtung Hirnoberfläche. Aufgrund massiver Artefakte durch Fixierungsprozesse des Gewebes wiesen die untersuchten Schnitte grundsätzlich eine färbeassoziierte Schrumpfung des Gewebes auf. Dies äußerte sich durch meist ringförmig angeordnete, gewebefreie Spalträume unterschiedlichen Ausmaßes unmittelbar um die vaskulären Anschnitte im Parenchym. Gewebsständige medulläre TMEM119-positive Mikroglia-Profile ließen sich perivaskulär in unmittelbarer Nähe zur Adventitia nachweisen. Aufgrund der Schrumpfungartefakte war eine detaillierte Beurteilung der potenziellen Assoziation der perivaskulären Mikroglia mit der Gefäßwand und Adventitia sowie mit der Basallamina jedoch nicht möglich.

In den kortikalen Anteilen ließen sich nur wenige Arterien und Venen in den untersuchten Gewebeproben differenzieren. Diese fanden sich insbesondere im Fundusbereich kortikaler Gyrusanteile. Im Gegensatz zur weißen Substanz ließ sich kortikal kein eindeutiges Verteilungsmuster der Mikroglia-Profile in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen differenzieren, eine spezifische Anordnung der Zellen in räumlicher Nähe zu kortikalen Gefäßen ließ sich nicht feststellen (siehe **Abbildung 7**). Ebenso wiesen kortikale immuno-positive Mikroglia keine strukturellen Veränderungen im perivaskulären Hirngewebe auf. Insbesondere konnte ein auffallender Verlust der Zellausläufer nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Mikroglia in den Zytospin-Präparaten der CSF-Proben

Die untersuchten CSF-Proben wiesen im Gegensatz zu den Schnitten in Übersichtsaufnahmen eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Zellen über die gesamte Fläche des Zytospins auf den Objektträgern auf (siehe **Abbildung 10**).

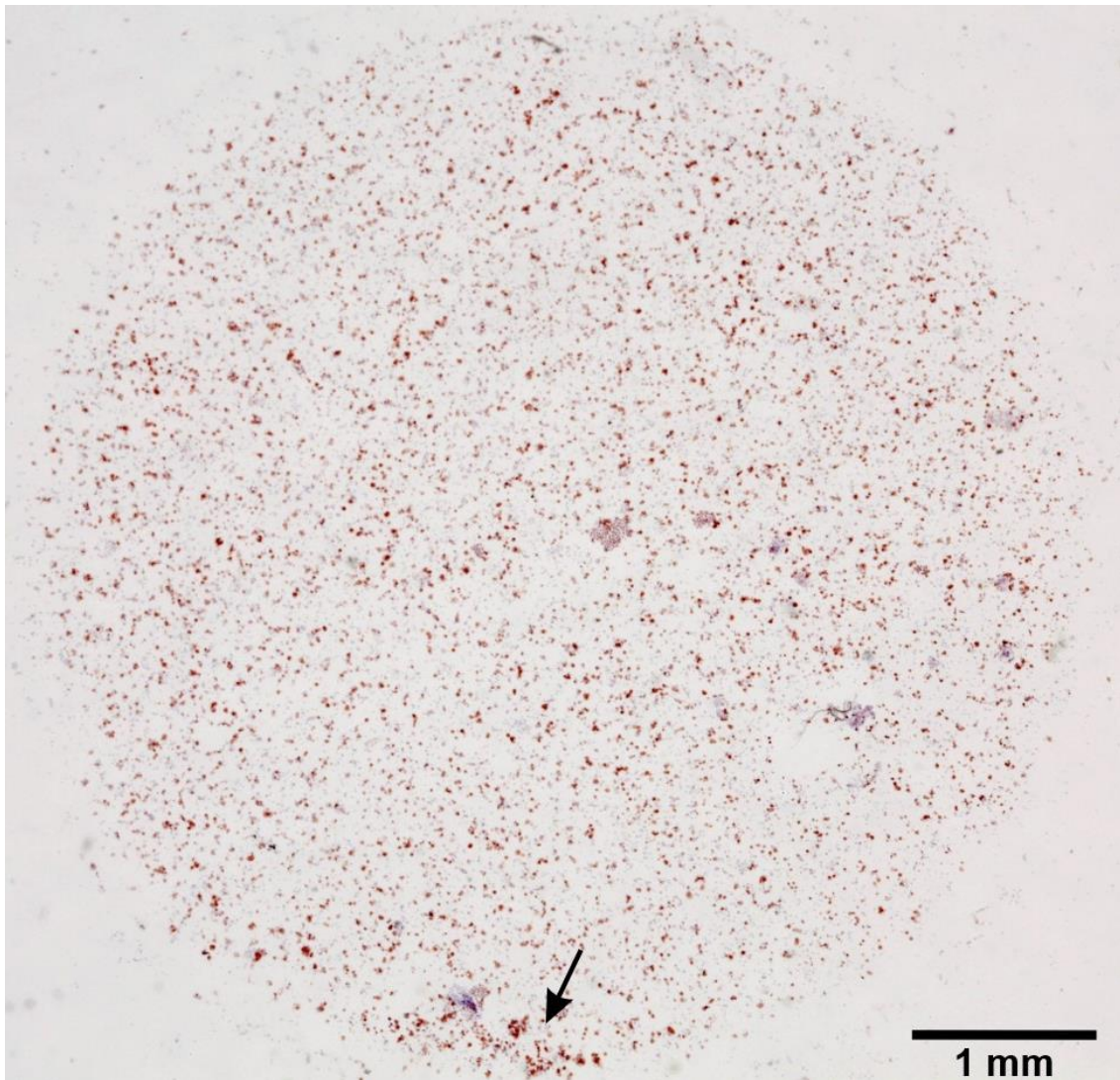


Abbildung 10: Übersichtsaufnahme eines exemplarischen CSF-Zytospins bei geringer Vergrößerung nach immunzytochemischer Färbung mit TMEM119

Zytospin-Präparat mit intensiv roter Färbung der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile, übrige Zellen bläulich, Maßstab wie angegeben. Fall der Gruppe „stark positiv“: 48 Jahre alte Frau mit MOV bei Sepsis (siehe **Abbildung 8**); PMI = 83 h. Areal mit gruppiert angeordneten immuno-positiven Mikroglia-Profilen bei 6 Uhr (**Pfeil**). Abbildung modifiziert nach [28].

Die überwiegende Anzahl der Zellprofile konnte einzeln und frei von Artefakten angetroffen werden. Stellenweise zeigten sich Konglomerat-ähnliche Abschnitte bestehend aus mehreren gruppiert angeordneten immuno-positiven Mikroglia-Profilen (siehe **Abbildung 10 (Pfeil)**). In Fällen mit besonders hoher Mikroglia-Profildichte der CSF-Probe in der Fallgruppe „stark positiv“ zeigte sich das gesamte Zytospin-Präparat durch die hohen Anteile an TMEM119-positiven, rötlich gefärbten Zellprofilen bereits in den Übersichtsaufnahmen intensiv gefärbt. In der Mehrzahl der Fälle war ein Rückschluss auf die Anzahl der immuno-positiven Mikroglia-Profile und Intensität der

Färbung im jeweiligen Präparat jedoch nicht lediglich anhand des makroskopischen Aspekts möglich. Die genaue Analyse der Mikroglia-Morphologie sowie die Quantifizierung der immunzytochemisch markierten, TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofile in der CSF erfolgte mittels mikroskopischer Betrachtung der Zytospins bei 100-facher Vergrößerung. Die markierten Zellprofile konnten durch die intensiv rote Farbe des Chromogens AEC gut von den übrigen, meist deutlich kleineren Zellprofilen unterschieden werden. Nach immunzytochemischer Färbung zeigten sich die TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in Form vergleichsweise großer Zellen mit rundlichem Zellkörper und klar definiertem, das Zytoplasma einrahmendem, intensiv rotem Saum. Die Farbintensität der immuno-positiven Areale zeigte sich über die Präparate hinweg gleichbleibend. In starker Diskrepanz zu den Ergebnissen der Schnitte konnten in keinem der untersuchten Zytospins Mikroglia-Profile mit Zellausläufern nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten keine Residuen von potenziell abgestoßenen Zellfortsätzen in den Zytospins identifiziert werden. In der Mehrheit der Fälle zeigten sich sowohl die immuno-positiven Glia-Profile als auch die übrigen Zellen intakt. Lediglich in Einzelfällen konnten hydropisch angeschwollene Zellen mit stellenweise lediglich unscharf begrenzten, TMEM119-positiven Randsäumen festgestellt werden.

3.3 Quantifizierung der Mikroglia-Profile

Die computer- und softwaregestützte quantitative Analyse der immunhistochemisch untersuchten Proben am Großhirn sowie den immunzytochemisch behandelten CSF-Proben erbrachte für Mark, Rinde und Zytospin jeweils fünf Einzelwerte der immuno-positiven Profile. Aus diesen Einzeldaten wurden je Fall manuell Mittelwerte der jeweiligen Mikroglia-Profildichte für die drei untersuchten Kompartimente ermittelt. Diese finden sich nach Fallgruppen angeordnet in **Tabelle 7**, **Tabelle 8**, **Tabelle 9** und **Tabelle 10**. Aus der softwaregesteuerten Analyse der immunhistochemisch nachgewiesenen TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in den Gewebeproben ergaben sich im Allgemeinen keine Widersprüche zu der manuellen qualitativen Beurteilung der Paraffinschnitte. Gleiches galt für die Untersuchung der CSF-Proben und der statistischen Auswertung zur Dichte immunpositiver Zellen im Zytospin-Präparat.

Die errechneten Mittelwerte der Profildichte ergaben für die einzelnen Kompartimente im gesamten Kollektiv sowie innerhalb der einzelnen Fallgruppen starke Schwankungen der Ergebnisse. Für die Rinde ergaben sich Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte zwischen gerundet 6 und 459. Die Dichte der Glia-Profile im Marklager der Paraffinschnitte schwankte hingegen zwischen Werten von 2 bis 512. In den Zytospins der Fallgruppe „negativ“ konnten definitionsgemäß keinerlei immuno-positive Zellprofile identifiziert werden, während die höchste TMEM119-positive Glia-Profildichte aller untersuchter Zytospins bei rund 303 lag. Grundsätzlich konnten immense Unterschiede zwischen den ermittelten Werten von Parenchym und CSF festgestellt werden. Während beide Untersuchungsmedien starken Schwankungen der Mikroglia-Profildichte aufwiesen, konnten in den Gewebeproben grundsätzlich immuno-positive Glia-Profile nachgewiesen werden. In den CSF-Proben zeigten sich hingegen sowohl Einzelfälle mit besonders hoher Profildichte als auch Fälle ohne Nachweis eines einzigen TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofils. Diese Ergebnisse spiegelten die unter 2.2.1 vorgestellte Gruppeneinteilung wider.

Tabelle 7: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „stark positiv“

Werte der ermittelten Profildichte in den untersuchten Kompartimenten Hirnrinde, Hirnmark und CSF-Zytospin der Fallgruppe „stark positiv“, gerundet auf eine Nachkommastelle.

Fallnummer	Rinde	Mark	Zytospin
1	271,4	191,6	138,8
2	180,2	174,6	252,0
3	65,8	161,8	171,2
4	217,0	224,8	300,2
5	107,0	46,8	148,2
6	130,2	75,8	286,2
7	47,6	373,2	255,8
8	318,4	248,8	130,4
9	97,2	142,8	36,4
10	192,6	67,8	62,6
11	132,8	120,0	88,2
12	129,8	100,8	61,8
13	155,0	125,8	54,2
14	110,4	116,0	158,6
15	91,0	47,0	303,0

Tabelle 8: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „positiv“

Werte der ermittelten Profildichte in den untersuchten Kompartimenten Hirnrinde, Hirnmark und CSF-Zytospin der Fallgruppe „positiv“, gerundet auf eine Nachkommastelle.

Fallnummer	Rinde	Mark	Zytospin
1	65,8	53,8	19,4
2	126,2	105,8	15,8
3	458,6	489,2	14,0
4	151,6	115,2	16,2
5	170,4	189,0	21,0
6	69,4	140,8	13,4
7	155,6	283,8	14,8
8	150,6	64,6	14,8
9	114,4	85,2	16,0
10	85,8	89,6	13,8
11	85,4	119,4	14,8
12	53,0	265,4	27,4
13	108	224,2	15,2
14	52,4	89,0	26,2
15	282,8	252,2	25,0

Tabelle 9: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „schwach bis negativ“

Werte der ermittelten Profildichte in den untersuchten Kompartimenten Hirnrinde, Hirnmark und CSF-Zytospin der Fallgruppe „schwach bis negativ“, gerundet auf eine Nachkommastelle.

Fallnummer	Rinde	Mark	Zytospin
1	241,6	280,0	1,2
2	43,4	115,6	2,6
3	116,6	132,4	1,4
4	246,4	251,2	2,6
5	51,0	40,4	2,6
6	259,2	438,4	3,4
7	83,8	101,4	2,6
8	34,2	13,6	8,4
9	15,0	10,0	7,4
10	19,4	18,8	7,8
11	129,8	61,0	5,0
12	129,8	61,0	3,8
13	10,2	19,4	5,2
14	49,2	67,6	5,0
15	9,0	3,6	2,0

Tabelle 10: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „negativ“

Werte der ermittelten Profildichte in den untersuchten Kompartimenten Hirnrinde, Hirnmark und CSF-Zytospin der Fallgruppe „negativ“, gerundet auf eine Nachkommastelle.

Fallnummer	Rinde	Mark	Zytospin
1	30,6	153	0
2	78,2	94,6	0
3	112,4	136,4	0
4	37,0	26,0	0
5	65,2	98,6	0
6	70,8	80,2	0
7	2,0	2,2	0
8	85,8	19,8	0
9	216,4	77,6	0
10	50,0	58,6	0
11	244,8	91,8	0
12	293,8	511,8	0
13	53,2	102,8	0
14	138,4	207,0	0
15	50,2	62,4	0

Es ergaben sich keine richtungsweisenden Hinweise für einen Zusammenhang zwischen den kortikalen TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichten und den ermittelten Todesursachen innerhalb des Fallkollektivs. Exemplarisch gegenübergestellte Fälle verdeutlichten die Schwankungen der jeweils ermittelten Profildichte trotz teils übereinstimmender Todesursache. In einem Fall der Gruppe „positiv“ mit autoptisch nicht bestimmbarer Todesursache konnte die höchste gemessene kortikale Mikroglia-Profildichte innerhalb des Fallkollektivs von 459 ermittelt werden. Ein Ertrinkungstod aus der Gruppe „negativ“ mit folglich 0 immun-positiven Mikroglia-Profilen in der CSF wies dagegen eine kortikale Dichte von 294 auf. Dieser Fall zeigte zeitgleich die höchste Dichte im Marklager mit gerundet 512 TMEM119-positiven Mikroglia-Zellprofilen. In Schnitten eines Falles mit Versterben aufgrund eines akuten Herzversagens konnte hingegen eine kortikale Profildichte von rund 318 nachgewiesen werden. Der Fall wies gerundet 130 positive Mikroglia-Profile in der CSF auf und wurde demnach der Fallgruppe „stark positiv“ zugeordnet. Insgesamt 11 der 60 Fälle ließen sich durch eine besonders hohe kortikale Profildichte mit Werten zwischen 216 und 459 charakterisieren. In 6 dieser Einzelfälle wiesen die zugehörigen CSF-Zytospins hingegen

eine besonders niedrige Mikroglia-Profildichte mit Werten zwischen lediglich 0 und 3 auf. Sie wurden demnach der Gruppe „negativ“ zugeordnet. Im Gegensatz hierzu gehörten zwei weitere dieser Fälle der Gruppe „stark positiv“ an, da sich in der Analyse der zugehörigen Zytospins Dichtewerte von jeweils 130 bzw. 300 ergeben hatten. Der Todeseintritt war in beiden dieser Fälle auf einen Myokardinfarkt zurückzuführen, in der Krankenvorgeschichte beider Fälle war darüber hinaus von mehreren bereits vorausgegangenen Infarkten berichtet worden. Ein Einzelfall mit einem zum Tode führenden Sturzereignis mit spinalem Trauma und Fraktur eines Halswirbelkörpers der Kategorie TBI wies in der Analyse der CSF mit einem Wert von 259 eine vergleichsweise hohe Dichte an TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen auf. Der Fall wurde demnach der Gruppe „stark positiv“ zugeordnet. Im zugehörigen Paraffin-Schnitt ergab sich für die Hirnrinde hingegen eine Dichte von lediglich gerundet 48, während im Marklager ein vergleichsweise hoher Wert von 373 ermittelt werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnten in einem weiteren Einzelfall der Kategorie TBI mit tödlichem Schädelbasisbruch in der CSF keine immuno-positiven Zellen nachgewiesen werden, der Fall wurde folglich in die Fallgruppe „negativ“ eingereiht. Im zugehörigen Hirngewebe konnte kortikal eine Profildichte von rund 31 ermittelt werden, medullär ergab sich ein Wert von rund 153.

3.4 Korrelation der ermittelten Mikroglia-Profildichte mit den erhobenen Daten

Nach Beurteilung von Verteilung und Morphologie erfolgte nach Quantifizierung der TMEM119-positiven Mikroglia die statistische Auswertung. Zwischen der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in den immunzytochemisch untersuchten CSF-Zytospins und der kortikalen TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte ergab sich eine Korrelation von statistischer Signifikanz (siehe **Abbildung 11**).

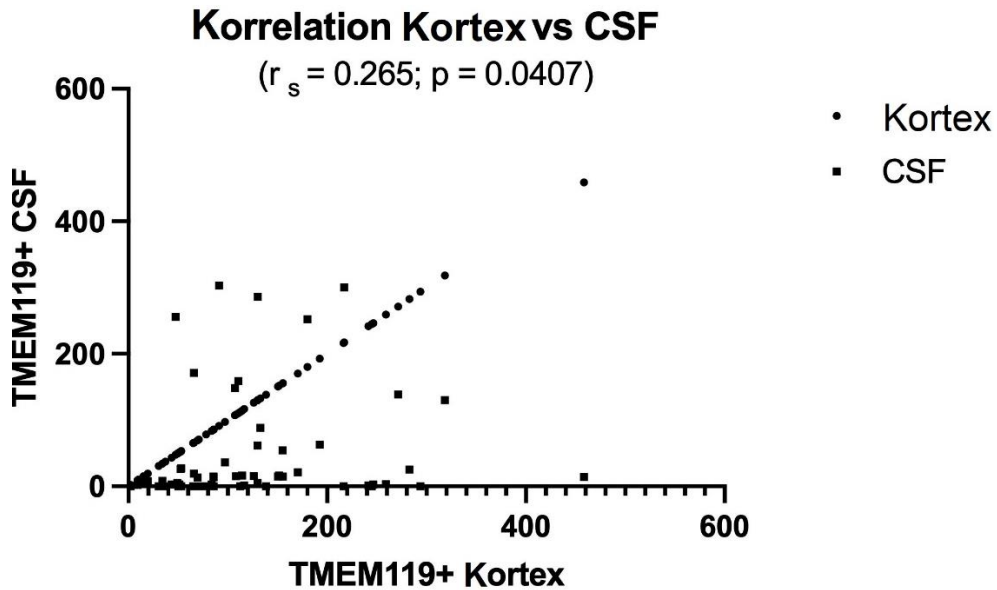


Abbildung 11: Korrelation zwischen der kortikalen Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen und der Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen in der CSF; statistisch signifikant.

Abbildung modifiziert nach [28].

Fälle mit einer hohen Dichte an immuno-positiven Mikroglia-Profilen im Kortex wiesen in der Analyse im Allgemeinen eine ebenfalls ausgeprägte immunhistochemische Färbung des Marklagers mit entsprechend hoher medullärer Dichte an TMEM119-positiven Zellprofilen auf (siehe **Abbildung 6 (d), (e) und (f)**). Die statistische Auswertung belegte die Korrelation zwischen der kortikalen TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte und der Mikroglia-Profildichte in der weißen Substanz (siehe **Abbildung 12**). Dieser Zusammenhang erwies sich ebenfalls als statistisch signifikant.

Zwischen den Ergebnissen der ermittelten Profildichte von Marklager und CSF-Zytospins ergab sich hingegen kein direkter Zusammenhang. Eine Korrelation statistischer Signifikanz zwischen der Dichte immuno-positiver Mikroglia-Profilen in der weißen Substanz und der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in der CSF konnte nicht hergestellt werden (siehe **Abbildung 13**).

Korrelation Marklager vs Kortex

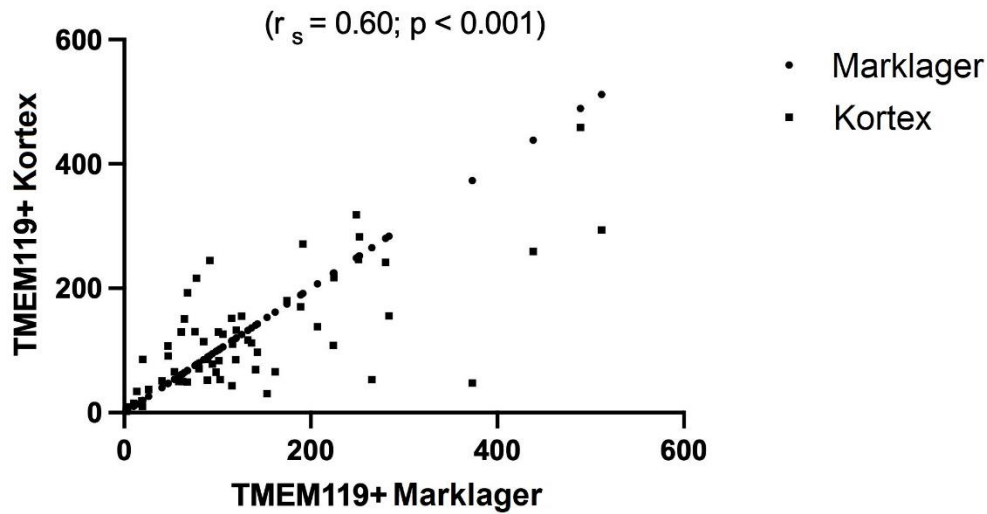


Abbildung 12: Korrelation zwischen der kortikalen Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen und der medullären Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen; statistisch signifikant.

Abbildung modifiziert nach [28].

Korrelation Marklager vs CSF

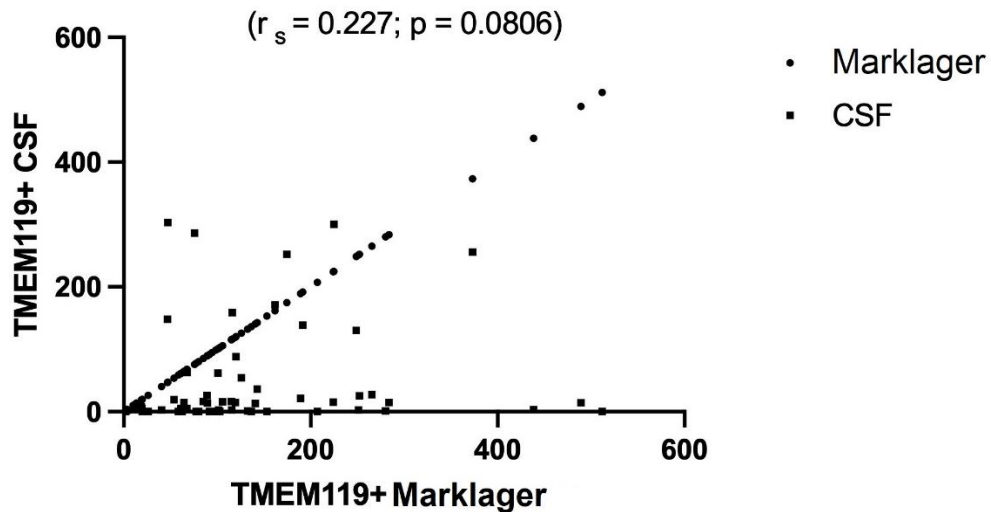


Abbildung 13: Korrelation zwischen der medullären Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen und der Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen in der CSF; statistisch nicht signifikant.

Abbildung modifiziert nach [28].

Das gewählte Fallkollektiv zeigte sich hinsichtlich der zusätzlich erhobenen Parameter Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR und BW der Einzelfälle sehr variabel. Die statistische Auswertung umfasste demnach auch die Untersuchung der potenziellen Einflussnahme dieser Faktoren auf die Intensität der CSF-Zytospin-Färbungen. Die gesammelten Daten wurden innerhalb einer Heatmap mit der Intensität der durchgeführten CSF-Färbungen gegenübergestellt. Die Zusammenhänge sind **Abbildung 14** zu entnehmen. Nach statistischer Analyse der erhobenen Werte ergab sich eine negative Korrelation von BW mit AGE. Eine positive Korrelation konnte u. a. zwischen BW mit SEX festgestellt werden. Ein negativer Zusammenhang ergab sich zwischen u. a. CPR und PMI. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen dem PMI und der CSF-Intensität festgestellt werden. Diese zeigte sich weiterhin unabhängig vom BW. Eine positive Korrelation fand sich hingegen zwischen CPR und der CSF-Intensität, während für die Todesursache und der Intensität der CSF-Probe kein Zusammenhang ermittelt werden konnte.

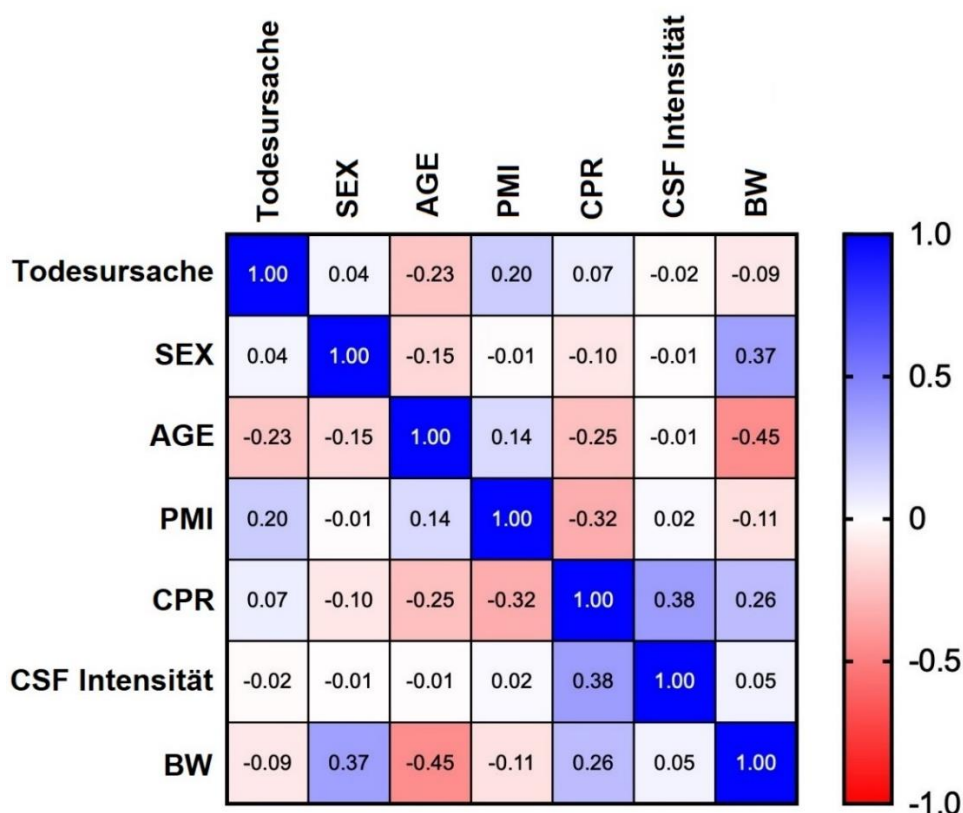


Abbildung 14: Heatmap mit Korrelationen der untersuchten Parameter mit der CSF-Intensität
 Statistischer Zusammenhang der erhobenen Parameter Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR, Intensität der CSF-Färbung und BW. Abbildung modifiziert nach [28].

4 Diskussion

Das unter 1.4 genannte Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Potenzial und die Aussagekraft der Untersuchung von postmortalen CSF aufzuzeigen und als Bestandteil der forensischen, rechtsmedizinischen Diagnostik zu etablieren. Im Zuge dessen sollte mittels Immunzytochemie an postmortalen CSF und Immunhistochemie an korrespondierenden postmortalen Hirngewebeasservaten mittels TMEM119 in insgesamt 60 Einzelfällen die entsprechende Mikroglia-Profildichte bestimmt werden. Anhand der ermittelten Werte sollte geprüft werden, inwiefern eine Korrelation zwischen der Profildichte immuno-positiver Mikroglia im Hirngewebe und derer in der CSF besteht. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Dichte TMEM119-positiver Mikroglia-Profile als Marker für neuropathologische Vorgänge etabliert werden kann.

Die Immunzytochemie der CSF-Zytospins konnte die Ergebnisse einer früheren Studie bestätigen, dass sich der okzipitale Subarachnoidalraum als weitgehend geschützter Ort zur Asservierung der CSF hinsichtlich der Untersuchung auf Mikroglia eignet [25]. Zeitgleich konnten innerhalb der 60 untersuchten Fälle immense Unterschiede in der Dichte immuno-positiver Mikroglia-Zellprofile nachgewiesen werden, die zur Einteilung der vier unterschiedlichen Fallgruppen führte. BW und PMI konnten als ausschlaggebende Faktoren in Bezug zur Menge der Mikroglia in der CSF ausgeschlossen werden, während sich hingegen ein Zusammenhang zwischen Wiederbelebungsmaßnahmen und der Mikroglia-Dichte ergab. Deutliche Unterschiede in Bezug auf die ermittelte Profildichte ergaben sich intraindividuell mit stark divergierenden Werten beim Vergleich zwischen Kortex und subkortikalem Marklager. Grundsätzlich konnte ein signifikanter Zusammenhang der Mikroglia-Profildichte des Kortex mit sowohl der Dichte der weißen Substanz als auch der der CSF ermittelt werden.

Neben der reinen Quantifizierung der Mikroglia-Profile ergaben Beobachtungen zum morphologischen Erscheinungsbild überraschenderweise markante Unterschiede zwischen Hirngewebe und den in der CSF identifizierten Mikroglia. Aus dem Verteilungsmuster in den Großhirnproben resultierten neue und relevante Erkenntnisse bezüglich des Verhaltens und der Funktion der Mikroglia innerhalb des ZNS. Neben dem Nachweis der laut der aktuellen Literatur gängigen bzw. identifizierten Mikroglia-Phänotypen konnten auffallend rundliche immuno-positive Zellen unter

augenscheinlichem Verlust ihrer Zellausläufer im Bereich der Hirnoberfläche und in Assoziation zu insbesondere medullären Gefäßen nachgewiesen werden. Es fanden sich demnach deutliche Hinweise, die auf einen Übertritt der Mikroglia in die CSF hindeuten, der zum einen über einen Gefäßzugang das Konzept des sog. glymphatic pathways untermauert, andererseits einen Transport der Mikroglia über die Hirnoberfläche wahrscheinlich macht.

4.1 Fallkollektiv

Die unter 2.2.1, 2.2.2 sowie 3.1 bereits aufgeführten Kriterien zur Datenerhebung und Auswahl des Gesamtkollektivs zeigen die Zusammensetzung der Fallgruppen, die mit insgesamt jeweils 15 Fällen einen soliden Umfang umfassten. Gleichwohl kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit einem größeren Gesamtkollektiv ein deutlicheres Ergebnis bzw. das Herausarbeiten weiterer Zusammenhänge möglich gewesen wäre. Die Geschlechterverteilung im Kollektiv zeigte sich relativ ausgeglichen mit 27 Frauen und 33 Männern. Die eingeschlossenen Fälle wiesen eine weite Spannbreite des Sterbealters mit Angaben zwischen 24 Jahren und 97 Jahren auf. Die Einteilung der Gruppen erfolgte anhand der CSF-Intensität der immunzytochemischen Untersuchung. Eine alternative Gruppeneinteilung wäre nach Abschluss der Analyse im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen ggf. zu diskutieren. Die 60 Einzelfälle wurden in einem Zeitraum von 2018 bis 2019 obduziert, wodurch ein weitgehender Ausschluss saisonaler Einflussfaktoren auf die Sterbefälle [121, 145, 194] garantiert werden konnte. Die Verteilung der Todesursachen zeigte sich weit gefächert, jedoch mit einem großen Überhang im Bereich der Herztodesfälle. Die Auswahl der Fälle erfolgte sehr sorgfältig anhand der aufgestellten Einschlusskriterien. Zeitgleich führte die Datenerhebung der jeweiligen Fallparameter (Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR, CSF-Intensität und BW) zu einem weit gefächerten Spektrum anamnestischer Zusatzinformationen, die zur Auswertung zur Verfügung standen. Eine umfassende und einheitliche, biografische und anamnestische Datenerhebung konnte hingegen nicht gewährleistet werden, da fallindividuell limitierte Informationen an die Obduzent:innen herangetragen wurden, wodurch der Gesamtumfang der grundsätzlich zur Verfügung stehenden Informationen innerhalb des Fallkollektivs starken Schwankungen unterlag. Aufgrund dessen wurde die Erfassung der Informationen in dieser Arbeit auf die vorgestellten einzelnen Parameter beschränkt, da diese für alle der eingeschlossenen Fälle ermittelt werden

konnten. Informationen zur CPR konnten fallindividuell lediglich unzureichend gesammelt werden. Grundsätzlich erscheinen für eine umfassende Beurteilung jedoch ebenfalls insbesondere sowohl die kurz- als auch langfristige Krankheitsvorgeschichte der Verstorbenen sowie die vollständige Erfassung aller relevanten Vorerkrankungen von deutlicher Relevanz. Diese Informationen standen im Vorfeld dieser Arbeit meist lediglich in einem ungenügenden Umfang zur Verfügung und konnten deshalb nicht mit einbezogen werden. Auch Informationen zur Medikamenteneinnahme lagen nur in wenigen der eingeschlossenen Fallbeispiele in vollem Umfang vor, gleichwohl ein deutlicher Einfluss bestimmter Wirkstoffe auf das ZNS und in Bezug auf das Verhalten der Mikroglia relevant erscheint [95, 100, 116, 126, 177]. In solchen Fällen, in denen eine tödliche Intoxikation mit körperfremden Substanzen anhand der anamnestischen Daten zunächst angenommen werden bzw. durch weiterführende Untersuchungen gesichert werden konnte, lagen in einer Vielzahl der Fälle lediglich geringfügige und wenig detaillierte Informationen zum genauen Konsumverhalten der jeweiligen Verstorbenen vor, wenngleich auch hier unterschiedliche Effekte verschiedener Substanzen auf das Verhalten der Mikroglia anzunehmen sind [24, 176, 208, 214]. Insbesondere bei Sterbefällen mit bereits bekannter Polytoxikomanie konnte die Gesamtheit der konsumierten Substanzen zumeist nur unzureichend ermittelt werden.

4.2 Methodik

Die routinemäßige Entnahme von Gewebeproben stellt einen festen Bestandteil einer rechtsmedizinischen Obduktion und stellte demnach keine Problematik dar. Durch limitierte Möglichkeiten im Hinblick auf Lagerung und Färbemethoden musste sich bei Asservierung der Gewebeproben auf einzelne Hirnareale des Frontalhirns und des Parieto-Occipitallappens beschränkt werden. Eine ganzheitliche Beurteilung des gesamten ZNS war demnach nicht möglich. Ein Vorteil der CSF als Untersuchungsmedium lag insbesondere in der Stabilität im Vergleich zu postmortalen Blutproben [25]. Die Asservierung der CSF zeigte sich ebenfalls unproblematisch durch leicht zugängliche Punktion des Spinalkanals während der Sektion. Limitiert wurde die Probengewinnung insbesondere durch das Vorliegen schwerer zerebraler Blutungsereignisse mit entsprechender Verunreinigung der CSF, schwerer Schädel-Hirn-Traumata, anderweitiger Verletzungen mit Beteiligung des ZNS bzw. des

Liquorraums oder bereits fortgeschrittener Fäulnisprozesse. Diese Fälle zeigten sich demnach im Gesamtkollektiv vergleichsweise unterrepräsentiert.

Grundsätzlich können externe Einflüsse sowie allen voran Autolyse und Fäulnisprozesse die Beschaffenheit von menschlichem Gewebe, demnach auch von Hirngewebe, im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen stark manipulieren und verschlechtern [33, 38, 210]. Von solchen Veränderungen ist mit steigendem PMI auszugehen. Die Qualität histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen kann hierdurch massiv zum Negativen beeinflusst werden, wodurch sich demnach ebenfalls Auswirkungen auf quantitative sowie qualitative Auswertungen an solchen Gewebeproben ergeben können. Durch die rechtliche Grundlage mit Notwendigkeit der Vorlage eines richterlichen Beschlusses als Grundvoraussetzung für eine gerichtliche Obduktion war eine aktive Verkürzung des PMI der eingeschlossenen Fälle nicht möglich. Durch die vorausgehenden Ermittlungsschritte und die rechtlichen Prozesse ergaben sich innerhalb des Fallkollektivs insgesamt sehr breit gestreute Werte für das PMI zwischen 10 h und 713 h. Autolyse und Fäulnisprozesse wurden jedoch durch umgehende Kühlung der Verstorbenen bei 4 °C maximal verlangsamt. Um wesentliche Nachteile bei den nachfolgenden immunhisto- und immunzytochemischen Verfahren möglichst ausschließen zu können, wurde weiterhin darauf geachtet, die asservierten Proben zeitnah weiterzuverarbeiten. Die CSF-Asservate wurden demnach gekühlt sowie dem Liquorlabor zeitnah zur Herstellung der Zytospin-Präparate übergeben. Die Gewebeproben wurden nach ausreichender Fixierung in Formalin weiterverarbeitet. Weiterhin kamen lediglich etablierte und sensitive immunzyto- und immunhistochemische Verfahren unter exakter Einhaltung qualitätsgeprüfter Färbeprotokolle zum Einsatz. Der Umgang mit den benötigten Reagenzien, Materialien und dem verwendeten Antikörper erfolgte unter größter Sorgfalt, die Färbungen jeweils unter Mitführung einer Positiv-Kontrolle. Zur groben Übersicht der Gewebe wurden von jedem Fall ebenfalls HE-Färbungen angefertigt. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die getroffenen Maßnahmen selbst bei Sterbefällen mit besonders hohem PMI valide Ergebnisse in den Untersuchungen der einzelnen Medien erlangt werden konnten, wenngleich zerebrovaskuläre Todesfälle mit herabgesetzter Qualität der Großhirnschnitte assoziiert waren. Auswirkungen auf die Qualität der Gewebeproben ergaben sich jedoch nicht nur durch postmortale Veränderungen mit herabsinkender Qualität, sondern ebenfalls färbeassoziiert [198]. Bei Durchsicht ergaben sich zahlreiche Präparate mit abschnittsweise deutlich ungleichmäßigen Färbungen insbesondere der

peripheren Schnittanteile, stellenweise konnten Einrisse bzw. Abrisse von Anteilen der Hirnschnitte festgestellt werden. Gemäß dem unter 2.3.3.2 vorgestellten Färbeprotokoll erscheint es wahrscheinlich, dass es trotz Einsatz Poly-L-Lysin-beschichteter Objektträger innerhalb einzelner (Wasch-)Schritte zum intermittierenden Ablösen in der Peripherie der Schnitte gekommen sein mag. Zudem zeigten sich in den immunhistochemischen Färbungen abnehmende Farbintensitäten in den unterschiedlichen Bereichen der Gyri. Mikroglia wiesen möglicherweise fixierungsbedingt in den Gyri eine stärkere immunhistochemische Reaktion mit stärkerem Farbverhalten auf als die Bereiche der Gyrus-Wände sowie im Furchengrund. Bei Durchsicht der HE-Kernfärbung zeigten sich unabhängig der Lokalisation hingegen keine Auffälligkeiten. In Fällen mit unzureichendem Ergebnis, ausgeprägten Artefakten oder Ablösung des Gewebes vom Objektträger wurde die immunhistochemische Färbung wiederholt.

Die Quantifizierung der Mikroglia-Zellprofile erfolgte standardisiert und softwarebasiert zum Ausschluss Untersucher:innen-abhängiger verfälschter Messwerte. Die manuell erstellten Filtereinstellungen schlossen nicht nur immuno-positive Zellkörper der Mikroglia in die Quantifizierung ein, sondern berücksichtigten ebenfalls TMEM119-positive Zellfortsätze. So wurde letztlich die Dichte der immuno-positiven Zellprofile erfasst, die Bestimmung einer absoluten Zellzahl war mit den gewählten Untersuchungsmethoden nicht möglich. Grundsätzlich konnten systematische Fehler in der Auszählung der Mikroglia-Profile nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung eines einheitlichen, präzisen Filters für alle Proben konnten Effekte auf das Gesamtergebnis jedoch minimiert werden. Auf Schnitten konnten häufig isolierte Zellfortsätze ohne Verbindung zu einem korrespondierenden Mikroglia-Zellkörper beobachtet werden. Unter der Annahme eines Zellkörperdurchmessers einer Gliazelle mitsamt des Zytoplasmasaums (Perikaryon) von etwa 12 µm und einer dreidimensionalen Ausdehnung der terminalen Verzweigungen bis in den Bereich von 30 µm [109] ist bei einer Schnittdicke von 6 µm die geometrische Wahrscheinlichkeit für einen Anschnitt der zahlreich verzweigten Fortsätze jedoch höher als für den Anschnitt des Perikaryons einer Mikrogliazelle. Systematische Serienschnitte und mühsame 3D-Rekonstruktionen könnten die noch offene Frage der Lokalisation der Perikarya in höher oder tiefer gelegenen Gewebeschichten klären. Allerdings konnten häufig kurze, verformte und verdrehte Fortsätze ohne Verbindung zu einem Perikaryon beobachtet werden, deren Anzahl vor allem in den oberen Anteilen der Lamina IIIa in Richtung auf

die Grenze zur Lamina II zunehmen. Dies spricht eher für ein Abstoßen und einen Verlust von Fortsätzen, was die Migration des übrig gebliebenen Perikaryons durch das Geflecht von Neven- und Astrogliafortsätzen der Lamina II und I in Richtung auf die Pia mater fördern würde.

Weiterhin schloss die Auswertung in der gewählten Methodik lediglich jeweils fünf repräsentative Ausschnitte der Gewebe- und CSF-Proben mit ein, um Mittelwerte zur Analyse der Mikroglia-Profildichte der einzelnen Kompartimente berechnen zu können. In denjenigen Hirnschnitten, die stark ausgeprägte, qualitative Unterschiede hinsichtlich der immunhistochemischen Färbung aufwiesen, wurde sich für die Auswertung auf die adäquat angefärbten Schnittanteile fokussiert. Artefaktreiche Areale wurden hingegen nicht berücksichtigt. Weiterhin konnten durch Limitierung der Untersuchung auf kleine Großhirnproben aus Frontal- und Okzipitallappen lediglich diese Hirnareale durch Ergebnisse der Untersuchungen widergespiegelt werden. Ein Rückschluss auf die Gesamtheit des ZNS ist damit nur eingeschränkt möglich.

4.3 Anti-TMEM119-Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhisto- sowie immunzytochemischen Untersuchungen postmortalen Hirngewebes sowie der zugehörigen CSF wurden anhand der Markierung des Transmembranproteins TMEM119 durchgeführt. TMEM119-positive Mikroglia konnten in jeglichen Hirnschnitten nachgewiesen werden, wenngleich sowohl unterschiedliche Zellkonformitäten als auch intra- sowie interindividuelle Unterschiede in der Dichte der Zellprofile in den Großhirnasservaten identifiziert werden konnten. Ebenfalls zeigten sich gemäß der Fallgruppenaufteilung immuno-positive Zellprofile in den CSF-Zytospins der Gruppen „stark positiv“, „positiv“ und „schwach bis negativ“ in unterschiedlicher Dichte.

Auf die Problematik der sicheren Differenzierung der Mikroglia von zentralnervösen Makrophagen und eingewanderten Monozyten wurde unter 1.2.4 bereits eingegangen. Satoh et al. berichteten in diesem Zusammenhang bereits 2015 vom großen Potenzial des Transmembranproteins TMEM119 bezüglich der Mikroglia-Forschung [172], trotz bislang unklarer Funktion des Proteins [217]. 2016 stellten Bennett et al. TMEM119 als stabilen [17] und spezifischen [17, 30] Marker menschlicher Mikroglia des reifen ZNS

[17] vor. Während alternative, bis dahin weit verbreitete Marker wie IBA1 ebenfalls in peripheren Makrophagen exprimiert werden und eine spezifische Differenzierung der Mikroglia demnach nicht ermöglichen konnten [11, 101], galt TMEM119 als geeignet, die Zellen von sowohl peripheren als auch residenten Makrophagen unterscheiden zu können [114]. Seither kam der Marker in vielen unterschiedlichen Untersuchungen zum Einsatz. 2020 gelang es, das Verhalten der Mikroglia am postmortalen Hirngewebe infolge tödlicher SHT mittels TMEM119 im Vergleich zu Kontrollfällen mit Verstorbenen kardiovaskulärer Todesursache zu untersuchen [27]. Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen am postmortalen Hirngewebe führten im Verlauf dank TMEM119 ebenfalls zu weiteren vielversprechenden Ergebnissen in Bezug auf Todesfälle durch Intoxikationen sowie auch in Bezug auf tödliche SHT [24, 29]. Bohnert et al. gelang es 2019, TMEM119 auch im Bereich der postmortalen CSF-Zytologie mit Immunzytochemie als validen Marker zu etablieren sowie den Nachweis intakter Mikroglia-Zellen in postmortalen CSF-Proben zu erbringen [25]. TMEM119 eigne sich vor allem für die Untersuchung der morphologischen Subtypen sowie der Dichte der Mikroglia [148] und wurde demnach auch in der vorliegenden Arbeit als Marker eingesetzt.

Young et al. kritisierten indes die Spezifität von TMEM119, nachdem sich in Untersuchungen zu ischämischen Schlaganfällen eine Differenzierung der Mikroglia von Makrophagen erschwert gezeigt hatte [217]. Weiterhin zeigte sich TMEM119 mitunter in Untersuchungen nach intrazerebralen Blutungen herunterreguliert [113]. Sowohl Young et al. als auch Li et al. bezogen sich in ihren Untersuchungen jedoch lediglich auf Versuche im Mausmodell und Untersuchungen nicht-menschlichen Gewebes. Ruan et al. konstatierten 2022 das Einhergehen herunterregulierter TMEM119-Markerproteine mit zunehmender Aktivierung der Mikroglia [165] und bezogen sich u. a. auf die Untersuchungen von Mercurio et al. [127], gemäß derer die Aktivierung der Mikroglia nach einem SHT durch Einziehen ihrer Fortsätze und eine Herunterregulierung von TMEM119 gekennzeichnet sei; eine Differenzierung der Mikroglia von Makrophagen durch TMEM119 sei im Umkehrschluss insbesondere unter pathologischen Bedingungen nicht möglich [11, 127]. Anzumerken ist jedoch, dass sich diese Ergebnisse ebenfalls lediglich auf Versuche am Tiermodell bezogen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf menschliche Gewebeproben unklar bleibt. Paolicelli et al. wiesen auf eine Stadium-abhängige Spezifität von TMEM119 für Mikroglia hin, wonach es besonders im Kontext von SHT, zerebralen Ischämien oder MS zu einer

Herunterregulierung von TMEM119 kommen könne [148]. Im gegenständlich ausgewählten Fallkollektiv zeigte sich eine Häufung der Fälle mit der Todesursachen-Kategorie „TBI“ vor allem in den Gruppen „schwach bis negativ“ und „negativ“ mit entsprechend niedrigen oder nicht nachzuweisenden Mikroglia-Profilen in der CSF. Analoge Auffälligkeiten in der Analyse der Gewebeproben konnten hingegen nicht ohne Weiteres festgestellt werden. Die entsprechenden Untersuchungen am menschlichen Hirngewebe konnten den ebenfalls beschriebenen Phänotyp der Mikroglia mit diffus gefärbten Zellausläufern und anteilig durch TMEM119 markiertem Soma nachweisen [148]. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen niedriger Mikroglia-Dichte in der CSF und dem Vorliegen eines TBI besteht, könnte anhand größerer Fallzahlen zum todesursächlichen SHT eingehender untersucht werden, wenngleich sich Paolicelli et al. in ihren Aussagen auf parenchymständige Mikroglia bezogen [148]. Vankriekelsvenne et al. äußerten nach ihren Untersuchungen an postmortalem Hirngewebe an MS erkrankter Patient:innen ebenfalls Skepsis an der Spezifität von TMEM119, nachdem ihnen der Nachweis von TMEM119 im murinen Lymphknoten- und braunem Fettgewebe gelungen war. Sie bezogen sich in ihren Untersuchungen jedoch nur in einem geringen Anteil auf die Arbeit mit menschlichem Gewebe, während der Großteil der Untersuchungen ebenfalls auf die Arbeit an tierischem Material entfiel [204]. Inwiefern sich durch die angebrachte Kritik eine Aussage zur Differenzierung zentralnervöser Mikroglia und Makrophagen mittels TMEM119 im menschlichen Gewebe [204] ableiten lässt, kann demnach nach jetzigem Forschungsstand nicht hinreichend sicher beurteilt werden.

Im Mausmodell konnte indes darüber hinaus das Transmembranprotein „*sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin-h*“, kurz Siglec-H, identifiziert werden [102]. Siglec-H zeigte sich für murine Mikroglia spezifisch und konnte unabhängig vom Stadium der Aktivierung auch unter pathologischen Bedingungen in Mikroglia nachgewiesen werden [101, 102]. CD44 bspw. wird im Gegensatz zu peripheren Zellen nicht auf der Oberfläche der Mikroglia exprimiert und könnte so ebenso für die Unterscheidung der Zelltypen eingesetzt werden [94]. Es bleibt zu erforschen, inwiefern weiterführende Untersuchungen gängiger und neuer Mikroglia-Marker wie IBA1 [148], CX3CR1 und potenziell Siglec-H [54] oder Oberflächenmarker wie CD44 [94], insbesondere in Kombination untereinander sowie mit TMEM119 und in Bezug auf die Untersuchung menschlichen postmortalen Gewebes, die sichere Identifizierung humaner zentralnervöser Mikroglia in kommenden Untersuchungen ermöglichen können.

4.4 Nachweis von Mikroglia im Hirnparenchym

4.4.1 Mikroglia-Profildichte in Kortex und Marklager

Es ergaben sich teils markante Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Schnitten hinsichtlich der nachgewiesenen TMEM119-positiven Mikroglia im Hirngewebe (siehe **Tabelle 7**, **Tabelle 8**, **Tabelle 9** und **Tabelle 10**). Die Unterschiede, die sich inter- wie intraindividuell beobachten ließen, standen im Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Fallkollektivs (siehe **Tabelle 3**, **Tabelle 4**, **Tabelle 5** und **Tabelle 6**). Grundsätzlich ließ sich zunächst kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild und der Dichte der telenzephalen Mikroglia sowie der zugrundeliegenden Todesursache des jeweiligen Sterbefalls erkennen. Während die Fallgruppe „negativ“ keinerlei Mikroglia-Profile in der CSF aufwies, konnten jedoch in jedem dieser Fälle Mikroglia-Profile im Hirngewebe nachgewiesen werden. Todesursachen mit erwartbarem schnellem Todeseintritt wie aus der Kategorie TBI mit bspw. todesursächlichem schweren SHT oder Polytraumata sowie akute Herztodesfälle waren insbesondere in der Fallgruppe „negativ“ vertreten. Sterbefälle mit nachweislich langem Krankheitsverlauf, bspw. infolge eines Multiorganversagens bei Sepsis, wurden hingegen häufiger der Gruppe „stark positiv“ zugeordnet. Diese Feststellungen implizieren die Fähigkeit der lokal ansässigen kortikalen sowie subkortikalen Mikroglia, auf äußere Umstände bzw. Pathologien innerhalb eines relativ kurzen Zeitintervalls reagieren zu können [45, 139], während das Auftreten der Mikroglia in der CSF mit einem längeren Verlauf assoziiert zu sein scheint. Gleichwohl ist jedoch anzumerken, dass sich akute Herztodesfälle anteilig auf alle Fallgruppen verteilt zeigten und einzelne Sterbefälle mit schnellem Todeseintritt (bspw. Polytrauma) ebenso in der Gruppe „stark positiv“ vertreten waren.

Wie in **Abbildung 12**, ersichtlich ergab die Analyse der Gewebeproben einen signifikanten Zusammenhang der nachgewiesenen Mikroglia-Dichte des Kortex und der des Marklagers. Dieses Ergebnis ließ wiederum auf eine enge Beziehung zwischen den in der Hirnrinde ansässigen Mikroglia und derjenigen des Marklagers schließen. Eine Kommunikation bzw. Aktivierung von Mikroglia über die Grenzen der Kompartimente hinweg ist demnach anzunehmen. Gleichwohl konnten in Einzelfällen teils markante intraindividuelle Unterschiede der jeweiligen Dichte in Mark und Rinde festgestellt werden. Während in der Literatur mitunter von einer grundsätzlich höheren Mikrogliazahl im Marklager berichtet wurde [108, 141], ergaben sich unter den hier untersuchten Fällen

ebenso teils deutlich erhöhte Dichtewerte der TMEM119-positiven Mikroglia im Kortex im Gegensatz zum korrespondierenden Marklager. Tan et al. berichteten indes von unterschiedlichen Mikroglia-Dichten in Abhängigkeit der jeweiligen Hirnregion [190]. Inwiefern dies einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse zur Dichte-Bestimmung in den untersuchten Hirnproben genommen haben kann, könnte durch direkten Vergleich von Hirnproben mit jeweils exakt identischer Lokalisation untersucht werden.

Grundsätzlich lag der Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit anhand der zugrundeliegenden Fragestellung auf der Analyse eines expliziten Zusammenhangs der erhobenen Fallparameter (Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR, und BW) mit der nachgewiesenen Mikroglia-Dichte in der postmortalen CSF und dem Zusammenhang zum Hirnparenchym. Die potenzielle Einflussnahme der erfassten Einzelfaktoren auch auf die Reaktion der telenzephalen Mikroglia ist anzunehmen. Ein solcher Zusammenhang wurde in der Analyse der Ergebnisse bei Fokussierung auf die CSF zunächst jedoch nicht untersucht. Weiterhin wurde in der Betrachtung der eingeschlossenen Sterbefälle innerhalb des Fallkollektivs keine explizite Unterscheidung zwischen akuten Todesfällen und solchen mit bereits langjährigen, chronischen Vorerkrankungen vorgenommen. Insbesondere der Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen [45, 85, 141, 173] sowie fortgeschrittene Alterungsprozesse des ZNS [173, 211] sind jedoch wie bereits vorgestellt von erheblicher Relevanz für das Vorkommen und die Verteilung der zentralnervösen Mikroglia. Eine explizite Gegenüberstellung der Ergebnisse solcher Sterbefälle mit denen eines plötzlichen Todeseintritts ohne lange Krankheitsvorgeschichte wurde zum jetzigen Stand nicht durchgeführt. Um die potenzielle Einflussnahme von bspw. neurodegenerativen Veränderungen auf die Verteilung und Dichte der Mikroglia im Hirnparenchym auch an postmortalen Großhirnproben untersuchen zu können, sollte eine solche Differenzierung der Fälle demnach in Zukunft miteinbezogen werden.

4.4.2 Morphologie und Verteilung

Neben der ursprünglich angestrebten Dichtebestimmung im Großhirn ergab sich bei Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen ebenso die Möglichkeit der morphologischen Differenzierung unterschiedlicher Mikroglia-Variationen und Phänotypen. In den Hirnschnitten konnten eine Vielzahl der in der Fachliteratur bereits beschriebenen gewebständigen Strukturmodelle der Mikroglia [11, 20, 94, 139, 148,

173] nachgewiesen werden. Sternförmig verzweigte Mikroglia mit zahlreichen feinen Fortsätzen zeigten sich ubiquitär über das Gewebe verteilt. Immuno-positive Zellausläufer ließen sich stellenweise mit steigendem PMI nur noch unscharf im Parenchym abgrenzen, während eine hohe Dichte von Zellfortsätzen sich gleichzeitig meist mit einer intensiven Färbung des Neuropils vergesellschaftet zeigte. Darüber hinaus konnten innerhalb einzelner Bereiche der Schnitte Unterschiede in der Anzahl, Reichweite und Ausrichtung der Zellausläufer einzelner Mikroglia-Profile differenziert werden. Weiterhin ergaben sich insbesondere in den kortikalen Anteilen markante Verteilungsunterschiede im Zusammenhang zur Zellmorphologie.

4.4.2.1 Kortikale Mikroglia

Insbesondere im Bereich der kortikalen Lamina I konnten im Gegensatz zu tiefer gelegenen Rindenanteilen sowie dem subkortikalen Marklager auffallend runde, immuno-positive Zellkörper identifiziert werden. Die damit eher amöboid konfigurierten TMEM119-positiven Mikroglia-Profile [201], die in direkter topographischer Nähe zur Großhirnoberfläche differenziert werden konnten, implizierten den Verlust bzw. eine Retraktion ihrer Zellfortsätze sowie eine Migration der Zellen in Richtung der weichen Hirnhaut bzw. des sich anschließenden subarachnoidalen Liquorraums. Solche amöboiden Mikroglia wurden in der Literatur zumeist mit einem aktivierten Zellstadium [47, 94, 107] und einer Reaktion auf einen Stimulus, insbesondere unter pathologischen Bedingungen [11, 148] in Verbindung gebracht. Folgt man dieser Annahme, so lieferten die erbrachten Ergebnisse zum Verteilungsmuster der Mikroglia in der Großhirnrinde Hinweise darauf, dass es sich bei den in Umgebung zur Hirnoberfläche nachgewiesenen TMEM119-positiven Glia um Zellen in einem aktivierten Stadium gehandelt haben muss und sich diese Zellen aktiv in dieses Areal begeben haben könnten. Migration der Mikroglia an den Ort eines pathologischen Reizes stellt wie bereits erläutert eine der grundsätzlichen Fähigkeiten der Mikroglia dar [139]. Demnach wäre eine lokale Erhöhung der Mikroglia-Dichte insbesondere in lokal begrenzten, geschädigten Hirnarealen oder Herdbefunden zu erwarten. Der Nachweis des auffälligen Verteilungsmusters im Kortex gelang jedoch u. a. in einem Fall einer tödlichen Kohlenmonoxidvergiftung (siehe **Abbildung 6**), der grundsätzlich eine globale und nicht lokale Schädigung des ZNS durch Sauerstoffmangel zugrunde liegt. In einem weiteren Fall mit Hypoxie-bedingtem Todeseintritt nach Aspiration zeigte sich ein vergleichbares Bild (siehe **Abbildung 7**). Das oberflächennahe Hirngewebe war in diesem Einzelfall

hingegen besonders squamös aufgelockert. Eine solche ödematöse Veränderung des Nervengewebes kann hinweisend auf eine potenzielle Störung der BBB sein. Sowohl einzelne als auch gruppiert angeordnete Mikroglia-Profile mit je nur geringgradig ausgebildeten bzw. keinen Zellfortsätzen konnten in diesen Kortexarealen identifiziert werden. Das Neuropil wies auch hier lose verteilte, einzelne Zellausläufer auf und zeigte Anteile der Hirnoberfläche mit bereits abgelöster Pia mater. Der Nachweis immuno-positiver Mikroglia-Profile implizierte unter den gegebenen Gewebeveränderungen die Möglichkeit eines passiven, diffusen Übertritts der Glia in die CSF im Zuge einer Vulnerabilität der physiologischen Barriere zwischen Hirnparenchym und Liquorraum. Weiterhin zeigte sich eine Assoziation der TMEM119-positiven Mikroglia mit noch partiell ersichtlichen Anteilen der Arachnoidea. Ein vergleichbares Verteilungsmuster der Mikroglia nahe der Hirnoberfläche konnte weiterhin im Fall eines septischen Geschehens nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8**). Einer Sepsis liegt im Zuge der systemischen Inflammation demnach ebenso eine globale Beeinträchtigung des ZNS zugrunde [43, 175, 189, 192]. In diesem Fall zeigten die oberflächennahen, immuno-positiven Mikroglia des Kortex direkten Bezug zur weichen Hirnhaut. TMEM119-positive Mikroglia-Profile konnten beim direkten Übertritt durch die Pia mater nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8**). Die Migration amöboider Mikroglia in die Nähe der Hirnoberfläche könnte demnach im aktiven Übertritt der Zellen in die CSF begründet sein. Diese Erkenntnis ließ auf eine Beziehung der ortsansässigen Mikroglia des Hirngewebes und der CSF schließen, durch die sich beide Kompartimente in ihrer Mikroglia-Dichte bedingen oder bei der zumindest die Mikroglia-Profildichte des Rindenparenchyms die Dichte der Mikroglia in der CSF beeinflusst. Dieser Zusammenhang konnte auch statistisch belegt werden (siehe **Abbildung 11**). Nachdem zwischen Marklager und der CSF hingegen kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (siehe **Abbildung 13**), die Dichte von Rinde und Mark jedoch miteinander korrelierten (siehe **Abbildung 12**), wäre eine Beziehung vom Mark zur CSF durch fortlaufende Reizweiterleitung über die kortikalen Hirnanteile potenziell denkbar. Der nachgewiesene runde Zelltyp mit Verlust bzw. Einziehen der Zellfortsätze auf dem Weg zur Oberfläche der Hirnrinde wäre grundsätzlich vereinbar mit einem erleichterten Übertritt der Zellen. Gleichzeitig bietet die durch Sulci und Gyri große Hirnoberfläche ein entsprechend großes Areal für den Austausch der Mikroglia vom Parenchym in die CSF. Das Marklager bietet mitsamt den Wänden des Ventrikelsystems weitaus weniger potenzielle Austauschfläche, was grundsätzlich eine mögliche Ursache der fehlenden Korrelation zwischen Mikroglia-Profildichte der CSF und des Markraums

darstellen könnte. In diesem Zusammenhang erscheinen insbesondere auch die periventrikulären Hirnanteile von besonderer Bedeutung. Miyata beschrieb bereits die Bedeutung der in den zirkumventrikulären Organen („*circumventricular organ*“, CVO) verorteten Mikroglia in Bezug auf die Informationsweitergabe an andere Hirnareale [128]. Andere Untersuchungen ergaben Hinweise auf den u. a. schädigenden Einfluss aktivierter Mikroglia auf das Ventrikelependym [59]. Subventrikuläre Mikroglia sollen im engen Austausch mit dem Ventrikelsystem und den Ependymzellen stehen [36]. Die in dieser Arbeit untersuchten Großhirnareale umfassten hingegen lediglich oberflächennahe Gyrus-Anteile mit Kortex sowie Marklager und wiesen demnach in keinem der eingeschlossenen Fälle Anteile des Ventrikelsystems bzw. des ventrikelnahen Hirnparenchyms auf. Insbesondere das Erscheinungsbild und Verteilungsmuster der periventrikulären Mikroglia sowie der Mikroglia in den CVO wären jedoch von immenser Bedeutung im Hinblick auf die bereits erlangten Erkenntnisse. Weitere immunhistochemische Untersuchungen entsprechender Hirnareale könnten, insbesondere unter Erhalt des Ependyms sowie der Plexus choroidei, eine potenzielle Assoziation der Mikroglia zu den Ependymzellen herausarbeiten. Über immunhistochemische Gewebeanalysen könnte auch der potenzielle Übertritt der Mikroglia über die Ventrikelwand und der Zugang zur CSF weiter untersucht werden.

4.4.2.2 Mikroglia im perivaskulären Hirngewebe

Wie unter 1.2.2.1 bereits erörtert handelt es sich bei der Mikroglia um mobile und dynamische Zellen innerhalb des ZNS [139]. Bereits 1957 wurde im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen die Eigenart der Zellen beschrieben, in Richtung Gefäße zu migrieren und sich letztlich im perivaskulären Spaltraum einzufinden [174]. Humane Mikroglia zeichnen sich zudem bereits in frühen Entwicklungsstadien des ZNS durch topographische Nähe zum zerebralen Gefäßsystem aus [130]. Bei Durchsicht der Schnitte konnte ebenfalls eine Assoziation der immuno-positiven Mikroglia zu den zentralnervösen Gefäßen festgestellt werden. Hierbei ergaben sich jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Kompartimenten des Großhirns. Die enge topographische Beziehung der Mikroglia zum vaskulären System äußerte sich vornehmlich im Bereich des Marklagers. Grundsätzlich konnten jedoch sowohl arterielle als auch venöse Gefäße überwiegend in den medullären Arealen der untersuchten Schnitte nachgewiesen werden. Die identifizierten Gefäße wiesen zudem unterschiedliche Kaliber und Anschnitte des Lumens auf. Medulläre TMEM119-positive Mikroglia-Profile zeigten in

der Umgebung vaskulärer Anteile ähnlich phänotypische Eigenschaften auf, wie sie auch in Bezug auf die Mikroglia nahe der Hirnoberfläche festgestellt worden waren. Die Zellprofile zeichneten sich ebenso durch einen eher runden Zellkörper ohne bzw. mit lediglich wenigen Fortsätzen aus, der annähernd amöboid imponierte (siehe **Abbildung 9**). In der direkten Umgebung konnten im perivaskulären Parenchym ebenso teils lose verteilte immuno-positive Zellausläufer festgestellt werden. Unter der Hypothese des potenziell aktiven Übertritts von Mikroglia über die weiche Hirnhaut wäre demnach bei Zugrundelegung der festgestellten Auffälligkeiten bezüglich der perivaskulär identifizierten Mikroglia auch ein Übertritt über die Gefäßwand unter Passieren der BBB in die Blutbahn denkbar. Perivaskuläre Mikroglia weisen eine Assoziation zur BBB auf [201]. Haruwaka et al. konnten in ihren Untersuchungen zudem zeigen, dass Mikroglia im Zuge inflammatorischer Umgebungsbedingungen einen ambivalenten Einfluss auf die Integrität der BBB ausüben können [79]. Dieser Arbeit zufolge seien die Zellen durch aktive Migration in die perivaskulären Parenchymanteile im Stande, direkten Kontakt mit den Endothelzellen aufzunehmen und hierdurch zum Erhalt der Integrität der BBB beizutragen. Gleichzeitig könne es im Kontrast hierzu durch den Einfluss der Mikroglia ebenso zu einer Beeinträchtigung der BBB kommen. Es zeigte sich außerdem, dass im Zuge chronisch inflammatorischer Krankheiten ein Rückgang sowie eine Verkürzung der Zellfortsätze der perivaskulären Mikroglia festgestellt werden konnte [79]. Der beschriebene Phänotyp stand damit weitgehend im Einklang mit der nachgewiesenen Zellmorphologie der Mikroglia-Profile in direkter Umgebung medullärer Gefäßprofile der hier untersuchten Schnitte und könnte demnach auf eine direkte Interaktion zwischen Mikroglia und der BBB hinweisen.

Die Anordnung der Mikroglia um die medullären Gefäßprofile könnte weiterhin im Zusammenhang mit dem bereits unter 1.3 beschriebenen Konzept des glymphatic pathway [5, 89] stehen. Mittels direkter Drainage der CSF über einen periarteriellen Spaltraum in das zentralnervöse Parenchym soll der kontinuierliche, anschließend perivenöse Abtransport und die effiziente Entsorgung etwaiger Stoffwechselprodukte, analog zum peripheren Lymphsystem, aus dem ZNS über kontinuierlichen Austausch der ISF mit der CSF gewährleistet sein [4, 18, 42, 74, 89, 92, 137, 163, 209]. Bei Betrachtung der auffälligen topographischen Assoziation der TMEM119-positiven Zellen im perivaskulären Marklager wäre demnach analog zur kortikalen Lamina I ebenso der Übertritt der Mikroglia in einen periarteriellen CSF-Zufluss im perivaskulären Spalt denkbar. Der Eintritt in die CSF über das glymphatische System könnte demnach neben

dem Weg über das Ventrikelependym und dem Übertritt der kortikalen Mikroglia über die Meningen einen alternativen Zugangsweg in die CSF darstellen. Richtungsweisende Hinweise für die Bedeutung des glymphatic pathway insbesondere in Bezug auf das Marklager des Großhirngewebes ergaben sich dahingehend, dass eine vergleichbare Assoziation der Mikroglia zum vaskulären System in den kortikalen Parenchymanteilen nicht festgestellt werden konnte. Es ergaben sich demnach Hinweise auf einen gewebespezifischen Zusammenhang der Verteilung der Mikroglia im perivaskulären Gewebe.

Eine genaue Analyse der Beziehung der Mikroglia zu den Gefäßen bzw. dem perivaskulären Spaltraum wäre demnach von großer Bedeutung für die Untersuchung der postmortalen Mikroglia-Dichte in der CSF. Eine genauere Differenzierung der Beziehung der TMEM119-positiven Zellen zur Gefäßadventitia konnte aufgrund teils massiver Artefakte der Parenchym Schnitte im Bereich der Gefäße jedoch nicht näher untersucht werden. Färbeassoziiert zeigten sich teils massive Schrumpfspalte in direkter Umgebung der Gefäßprofile. Insbesondere eine potenzielle Assoziation der Mikroglia zur Basalmembran und den Endothelzellen wäre in diesem Zusammenhang jedoch von entscheidender Bedeutung.

4.5 Nachweis von Mikroglia in der CSF

4.5.1 Morphologie und Verteilung

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen der CSF-Proben konnten eine allgemeine Pleozytose der postmortalen CSF [25, 154] bestätigen. Ausgehend vom erstmaligen immunzytochemischen Nachweis der Mikroglia in der postmortalen CSF mittels TMEM119 durch Bohnert et al. [25] konnten die Ergebnisse dieser Arbeit auf diesen Erkenntnissen aufbauen. Ein Hauptaugenmerk lag zum einen in der Identifizierung und zum anderen im Versuch der Klassifizierung der stellenweise stark variierenden Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia. Die Auswahl der Einschlusskriterien für die vier gebildeten Fallgruppen (siehe **Tabelle 1**) erfolgte anhand der Dichte in der CSF und noch vor Durchführung der Auswertungen der Paraffin-Schnitte. Im Hinblick auf die Ergebnisse der quantitativen Auswertung am

Großhirngewebe wurde bereits für weiterführende Untersuchungen auf eine alternative Gruppeneinteilung hingewiesen.

Während Bohnert et al. im Jahr 2019 zunächst den immunzytochemischen Nachweis TMEM119-positiver Mikroglia in der postmortalen CSF liefern konnten [25], wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Morphologie der nachgewiesenen Mikroglia in der CSF genauer untersucht und in direkten Vergleich mit dem phänotypischen Erscheinungsbild der Mikroglia in der gängigen Literatur sowie den Gewebeproben dieser Arbeit gesetzt. Während Augusto-Oliveira et al. [11] oder jüngst Paolicelli et al. [148] für die Mikroglia im Hirngewebe sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen zahlreicher Strukturformen beschrieben hatten [11, 148], die im Zuge der immunhistochemischen Untersuchungen auch in den hier untersuchten Hirnschnitten nachgewiesen werden konnten, wies die Mikroglia der postmortalen CSF einen einheitlichen Phänotyp auf (siehe **Abbildung 10**). Die immuno-positiven Zellprofile waren über das jeweilige Zytopsin-Präparat annähernd gleichmäßig verteilt. Charakteristisch zeigte sich ein vergleichbar großer, runder Zellkörper mit großem, klar erkennbarem Zellkern. Die mittels TMEM119 markierten Anteile fanden sich in der Zellmembran als rundlicher, roter Saum. Die nachgewiesenen Mikroglia in der postmortalen CSF entsprachen in ihrem Phänotyp demnach den Untersuchungen aus 2019 [25] und ähnelten im Allgemeinen der Zellmorphologie peripherer Makrophagen bzw. dem amöboiden Mikroglia-Subtyp [11]. Im Gegensatz zum überwiegend vorgefundenen Phänotyp der Schnitte wiesen die Zellprofile in der CSF lichtmikroskopisch keinerlei Zellausläufer auf. Elektronen-mikroskopische Aufnahmen, wie sie Tremblay et al. bereits zur Identifizierung feinsten Zellvorsprünge genutzt hatten [195], wurden bei limitierten Untersuchungsmöglichkeiten nicht hergestellt. Zu diskutieren bleibt, inwiefern sich die Klassifizierung der morphologischen Subtypen Parenchym-ständiger Mikroglia auf Zellprofile in der postmortalen CSF übertragen lässt. Das Vorliegen aktivierter Mikroglia in der CSF könnte jedoch potenziell auf eine spezifische Funktion der Mikroglia im Liquorraum hindeuten.

4.5.2 Übertritt der Mikroglia in die CSF

Durch den Nachweis eines statistischen Zusammenhangs zwischen der Dichte TMEM119-positiver Mikroglia im Kortex und der der postmortalen CSF konnte der Beleg eines Zusammenhangs zwischen den Mikrogliazellen der Hirnrinde und denen der CSF

erbracht werden. Dieser Zusammenhang mit dem Hirnparenchym ließ demnach mehrere Hypothesen zu. Ein passiver Übertritt der Zellen in die CSF wäre demnach durch einen diffusen Übertritt der Zellen in den Liquorraum grundsätzlich denkbar. Ein solcher wäre bspw. unter der Annahme einer Schrankenstörung oder einer Verletzung der Hirnhäute unter pathologischen Bedingungen mit Möglichkeit eines Zellaustausches zwischen Hirnparenchym und CSF zu vereinbaren. Hinweise hierfür ergaben sich insbesondere bei genauerer Untersuchung der lichtmikroskopischen Aufnahmen eines Falles mit hypoxisch bedingtem Todeseintritt nach Aspiration (siehe **Abbildung 7**). Ein rein auf postmortale Veränderungen zurückzuführender, durch Autolyse und Fäulnis begünstigter Übertritt der Zellen in Abhängigkeit eines steigenden PMI konnte hingegen statistisch widerlegt werden. Weiterhin deuteten die Auffälligkeiten der identifizierten Zellmorphologie in CSF und Hirnparenchym sowie das spezielle Verteilungsmuster der Mikroglia im Großhirngewebe auf einen kausalen Zusammenhang beider Kompartimente hin. Die Zellprofile in der postmortalen CSF ähnelten in der Gesamtschau den Mikrogliazellen, die im Hirnparenchym oberflächennah sowie perivaskulär nachgewiesen worden waren. Runde, amöboid erscheinende Zellen ohne Zellausläufer in der CSF entsprachen demnach nicht dem überwiegenden Zelltyp des Hirngewebes und den sog. resting microglia mit stark verzweigten Zellausläufern. Ein diffuser Übertritt der Zellen durch durchlässige Kompartimentsgrenzen und Verletzungen von zentralnervösen Grenzstrukturen würde demnach zumindest anteilig verzweigte Mikroglia in den immunzytologischen Untersuchungen der CSF erwarten lassen. Der passive Verlust von Zellausläufern im Sinne eines „Abreißens“ würde mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Auftreten von Mikroglia mit defekter Zellmembran und Färbeartefakten durch lose, jedoch weiterhin TMEM119-positive Zellfortsatzreste in den jeweiligen Zytospins einhergehen. Das einheitliche Auftreten intakter Mikroglia-Profile ohne Zellausläufer sowie das Fehlen TMEM119-positiver Artefakte in den Zytospins ließen hingegen auf einen aktiven Übertrittsprozess in die CSF der Zellen schließen.

Die Übereinstimmung des Phänotyps zwischen CSF und oberflächennahem sowie perivaskulärem Hirngewebe unterstützt die Annahme, dass Mikroglia potenziell Zugang zur CSF innehaben. Die Hypothese eines aktiven Übertritts der Mikroglia aus dem Hirnparenchym in die CSF steht im Einklang mit den Erkenntnissen der Analyse der Großhirngewebeproben. Der immunhistochemische Nachweis TMEM119-positiver Mikroglia beim Durchtritt durch die Pia mater (siehe **Abbildung 8**) stützt demnach diese Annahme. Aktiv in die CSF entsendete, vollfunktionsfähige Mikroglia wären im Stande,

ihre vielfältigen Funktionen ebenso im Bereich der CSF aufzunehmen und damit ganzheitlich auf das ZNS einzuwirken. Denkbar wären in diesem Zusammenhang bspw. die Ausschüttung bestimmter Mediatoren mit einer hieraus resultierenden globalen zentralnervösen Antwort auf ein zunächst lokal beschränktes Ereignis bzw. eine fokale Pathologie. Auch die Ausbreitung inflammatorischer Gewebereaktionen oder die Rekrutierung peripherer Immunreaktionen wären auf diesem Wege potenziell denkbar. Im Zuge dessen wären so insbesondere die hohe Zelldichte in der CSF von Sterbefällen im Rahmen länger anhaltender und schwerer Erkrankungen, wie z.B. septischen Geschehen [37, 131, 192] mit global schädigendem Einfluss auf das ZNS zu erklären (siehe **Abbildung 10**).

Grundlegend ergab sich aufgrund dieser Annahmen jedoch eine weitere zentrale Fragestellung: *Zu welchem Zeitpunkt gelangen Mikroglia aus dem Hirnparenchym in den Liquorraum?* Die Ergebnisse implizierten, dass der Übertritt der Mikroglia in die CSF ein längeres Zeitintervall in Anspruch zu nehmen scheint, als es die Reaktion der im Parenchym ansässigen Mikroglia bedarf. Es könnte ein sogenanntes Passage Delay zwischen Hirngewebe und Subarachnoidalraum bestehen [29]. So wiesen Todesfälle mit schnell eintretendem Tod (bspw. fulminanter Myokardinfarkt) im CSF-Zytospin eine geringe Dichte oder gänzlich fehlende von TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen auf, während sich in den korrespondierenden Gewebeproben eine jeweils bereits hohe Dichte differenzieren ließ. Zwei weitere Fälle eines akuten Myokardinfarkts wiesen hingegen sowohl kortikal als auch im CSF-Zytospin eine jeweils hohe Dichte an Mikroglia auf. Beide Fälle wiesen jedoch auch eine ausgeprägte Krankheitsvorgeschichte mit multiplen vorausgegangenen Myokardinfarkten auf. Der Nachweis hoher Mikroglia-Profildichten in der CSF in diesen Fällen impliziert, dass der Übergang der Zellen in die CSF eine gewisse Zeit in Anspruch nehmen muss. Kortikale und subkortikale Mikroglia erscheinen demnach in der Lage, vergleichsweise schneller auf interne und externe Einflüsse reagieren zu können. Der Übertritt der Mikroglia in die CSF, ob aktiv oder passiv, scheint demnach einem zeitlichen Verzögerungsintervall zu unterliegen, wobei die genauen Umstände und Einflussfaktoren auch anhand der ermittelten Ergebnisse dieser Arbeit zunächst unklar bleiben. Eine nähere Betrachtung der Krankenvorgeschichte einbezogener Sterbefälle, wie unter 4.4 bereits erörtert, könnte in diesem Zusammenhang zu weiteren Erkenntnissen führen.

4.5.3 Einfluss der erhobenen Fallparameter auf die Mikroglia-Profildichte in der postmortalen CSF

Im Zuge der Analyse der postmortalen CSF ergaben sich als Grundlage der Gruppeneinteilung teils massive interindividuelle Unterschiede in der nachgewiesenen Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile. Zusammenfassend ließen die Ergebnisse mehrere Hypothesen zu. Die teils starken Unterschiede in der Dichte der Mikroglia-Profile in den CSF-Proben ließen auf zunächst unklare Faktoren schließen, die das quantitative Aufkommen der Zellen im Liquorraum beeinflussen müssen. Die systematische Erfassung zusätzlicher Parameter zu jedem der einzelnen Sterbefälle ermöglichte die Untersuchung mehrerer potenzieller Einfluss- und Störfaktoren auf die Intensität der postmortalen CSF. Die Untersuchungen der zunächst naheliegendsten Parameter zu Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR und BW ließen auf einen Einfluss von der CPR auf die Mikroglia-Dichte in der CSF schließen und konnten insbesondere das PMI als relevanten Einflussfaktor ausschließen.

4.5.3.1 Zusammenhang der CSF-Intensität mit Gehirngewicht, Sterbealter und Geschlecht

Wie in **Abbildung 14** ersichtlich, zeigte sich das BW von AGE und SEX abhängig. Mit abnehmendem BW bei Anstieg des Lebensalters entsprachen die erfassten Daten damit der allgemeingültigen Auffassung sowie der aktuellen Studienlage zur Reduzierung der Hirnmasse im Zuge von Alterungsprozessen [21, 49, 78, 152, 170, 187, 212]. Gleichwohl ist das männliche Geschlecht per se mit einem höheren BW vergesellschaftet [49, 78, 153, 187], was die Messergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Nebenbefundlich wurde so die Validität der erhobenen Messwerte zum ermittelten BW durch den bestehenden Zusammenhang mit AGE und SEX belegt, wenngleich andere potenzielle Einflussfaktoren nicht berücksichtigt wurden [22, 153]. Die CSF-Intensität zeigte keinen Zusammenhang mit SEX und BW. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Untersuchungen, die unterschiedlich hohe Zellzahlen in der postmortalen CSF in Abhängigkeit vom Alter feststellen konnten [154], ergab sich anhand der erhobenen Daten weiterhin keine Korrelation der Mikroglia-Profildichte der postmortalen CSF mit dem Sterbealter.

4.5.3.2 Einfluss der Todesursache auf die CSF-Intensität

Im Widerspruch zu anderweitigen Untersuchungen, in denen auf molekularer Ebene variierende Zusammensetzungen der postmortalen CSF in Abhängigkeit von der Todesursache nachgewiesen worden waren [90, 111, 158], konnte anhand der hier erhobenen Daten kein Zusammenhang der CSF-Intensität und der zugrunde liegenden Todesursache festgestellt werden. Wie unter 4.5.2 jedoch bereits erläutert, ergaben sich in einzelnen Fällen Hinweise darauf, dass die Krankenvorgeschichte im direkten Bezug zur Todesursache Einfluss auf die Mikroglia-Dichte in der CSF nehmen könnte. Eine differenziertere Betrachtung der Todesursachen als in den hier vorgenommenen übergeordneten Kategorien wäre demnach potenziell geeignet, in weiterführenden Untersuchungen zur Identifizierung einzelner ausschlaggebender Faktoren (z. B. letale Überdosis einer bestimmten körperfremden Substanz) beizutragen. Grundsätzlich ließe sich in diesem Zusammenhang auch eine alternative Einteilung oder individuelle Betrachtung der Todesursachen realisieren.

4.5.3.3 Effekte von Reanimationsmaßnahmen auf die CSF-Intensität

Maßnahmen zur CPR wurden zu jedem Sterbefall sorgfältig abgefragt. In insgesamt fünf der Fälle konnten seitens der Ermittlungsbehörden hierzu jedoch keine Angaben gemacht werden. Statistisch ergab sich für die übrigen eingeschlossenen Einzelfälle eine negative Korrelation der CPR und der PMI. Dieser Zusammenhang lässt sich schlüssig durch den kurzen Zeitraum erklären, für den eine Reanimationsbehandlung einer leblosen Person grundsätzlich sinnvoll erscheint. Die CPR ist in ihrer therapeutischen Wirksamkeit aufgrund externer Einflüsse interindividuell stark limitiert und wird bei Vorliegen von Anzeichen eines längeren PMI nicht mehr zur Anwendung kommen, während in Akutereignissen (bspw. einem beobachteten Herzinfarkt oder Verkehrsunfall) Erste-Hilfe-Maßnahmen durchaus effektiv sein können. Wie in **Abbildung 14** weiterhin ersichtlich, konnte dagegen ein positiver Zusammenhang zwischen der CPR und der CSF-Intensität ermittelt werden. Die genaue Ursache dieser Korrelation bleibt zunächst unklar. Zu diskutieren wäre beispielsweise eine potenzielle Mobilisation hirnrindenständiger Mikroglia unter pathologischen Bedingungen mit anschließendem Übertritt der Zellen in die CSF. Hinweise auf einen solchen Übertritt der Zellen an der Hirnoberfläche ergaben sich demnach wie bereits erläutert in den

immunohistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit (siehe **Abbildung 6**, **Abbildung 7** und **Abbildung 8**). Von Interesse erscheinen in diesem Zusammenhang auch die begünstigenden Faktoren für solch eine Mobilisation der Mikroglia durch externe Einflussfaktoren. In Bezug auf die CPR wären hierfür insbesondere die Dauer der Wiederbelebensmaßnahmen, das Ausmaß der Hypoxie und Ischämie des Gewebes sowie die zugrundeliegende Ursache der Reanimationspflichtigkeit denkbar. Auch diese Daten konnten nur teilweise für die eingeschlossenen Fälle erhoben werden. Weiterhin implizieren die Ergebnisse, dass das Aufrechterhalten einer Blutzirkulation Einfluss auf die Dichte der Mikroglia in der CSF ausüben könnte. So konnte in der Fallgruppe „negativ“ lediglich ein einziger Fall identifiziert werden, bei dem eine CPR vorgenommen worden war. Mit Ausnahme eines weiteren Falles wiesen 13 Sterbefälle anamnestisch keine Wiederbelebensmaßnahmen auf. Hieraus ist abzulesen, dass ein zumindest zeitweise Aufrechterhalten des zerebralen Blutflusses im Zusammenhang mit der CSF-Intensität zu stehen scheint und ggf. zu einer höheren Dichte an Mikroglia-Profilen in der CSF führen kann.

4.5.3.4 CSF-Intensität in Abhängigkeit vom PMI

Zu jedem der eingeschlossenen Einzelfälle wurde anhand der vorliegenden Daten das jeweils individuelle PMI errechnet. Das PMI definiert sich grundsätzlich als Zeitintervall zwischen Eintritt des Todes bzw. der Auffindung [8] und Untersuchung [171] des Leichnams. Die Bestimmung eines genauen PMI stellt bis heute eine der großen Herausforderungen der rechtsmedizinischen Tätigkeit und forensischen Arbeitsweise dar [38, 50, 82, 168, 205, 210], da sie die Kenntnis eines genauen Todeszeitpunkts voraussetzt. Das Potenzial zur Definierung eines exakten Todeszeitpunkts ist hingegen bislang limitiert auf u. a. die Beurteilung der sicheren Todeszeichen, Tests supravitaler Körperreaktionen, Beurteilung potenzieller Fäulnisprozesse sowie postmortale Temperaturmessungen, diese im Speziellen nach Henßge [83, 84, 178] oder nach Mall [88, 124, 125, 134]. Hieraus kann jedoch meist lediglich auf grobe Zeitraumangaben zum Todeseintritt geschlossen werden [8, 32]. Zahlreiche sowohl in- als auch extrinsische Faktoren können die postmortalen Prozesse teils immens beeinflussen [50]. Alternative Untersuchungsmethoden, die es ermöglichen, den Todeseintritt genauer zu definieren, sind Gegenstand aktueller Forschung [56, 65, 110, 168]. Zur Erfassung der PMI wurden in der vorliegenden Arbeit die Angaben aus den jeweiligen Todesbescheinigungen sowie die Zeitpunkte der Obduktion herangezogen. Es muss demnach davon ausgegangen

werden, dass es fallindividuell zu Abweichungen zwischen errechnetem und „realem“ PMI gekommen sein kann (stellenweise lediglich Angabe des Auffindezeitpunkts eines Leichnams mit darauffolgender Feststellung des Todes versus frustrane CPR mit genauer Angabe des Versterbens). Lediglich spärliche Informationen konnten weiterhin für diejenigen Zeiträume erhoben werden, die von Verstorbenen nach Akutereignissen bzw. nach Traumata zunächst überlebt worden waren. Gleiches galt grundsätzlich für Angaben zur Agonie. Starke Veränderungen hinsichtlich des Verhaltens der Mikroglia im ZNS sind jedoch u. a. insbesondere in der akuten, posttraumatischen Phase zu erwarten [16, 120] und wären demnach auch für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit von Relevanz, konnten jedoch nicht genauer untersucht werden.

Postmortale Veränderungen in der Zusammensetzung und Qualität der CSF in Abhängigkeit von einem steigenden PMI wurden bislang angenommen. De-Giorgio et al. konnten im Versuch zur Eingrenzung des PMI über postmortale computertomographische Hirnscans Hinweise auf eine Reduktion der Seitenventrikelvolumina sowie eine Dichtezunahme der CSF in Abhängigkeit vom jeweiligen Zeitintervall finden [48]. Diese Ergebnisse könnten u. a. durch eine postmortale Flüssigkeitsreduktion der CSF, z. B. durch Versacken ins Parenchym oder einen Zellübertritt aus dem Parenchym in die CSF, bspw. im Rahmen einer postmortalen Schrankenstörung, erklärt werden. Steigende Zellzahlen in der postmortalen CSF seien demnach mutmaßlich ein lediglich postmortales Artefakt [133, 154] und das Ergebnis autolytischer sowie fäulnisbedingter Prozesse, die im Zusammenhang mit dem PMI zu sehen sind [213]. Die Auswertung der hier zugrundeliegenden Daten ergab hingegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem PMI und der Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profilen in den CSF-Proben (siehe **Abbildung 14**). Folgt man dem, so scheint das PMI zunächst keinen Einfluss auf die Anzahl der Mikroglia in der CSF auszuüben. Das längste PMI von 713 h war zwar mit einer vergleichsweise hohen Mikroglia-Dichte und der Fallgruppe „positiv“ assoziiert, gleichzeitig wies ein Fall der Gruppe „stark positiv“ hingegen das kürzeste PMI des gesamten Fallkollektivs von lediglich 10 h auf. Diese Ergebnisse wurden durch die statistische Analyse bestätigt. Eine starke Einflussnahme durch ein steigendes PMI mit fortschreitender Autolyse und Fäulnisprozessen konnte für die eingeschlossenen Fälle dieser Arbeit demnach widerlegt werden. Ganz im Gegenteil bestätigten die Resultate die postmortale CSF hingegen als valides und stabiles Untersuchungsmedium [9].

Durch Beschränkung auf die Erfassung des PMI als Zeit zwischen Todes- bzw. Auffindezeitpunkt und der Sektion wurde der Einfluss der Art der Leichenaufbewahrung und -kühlung sowie insbesondere deren Länge außer Acht gelassen. Grundsätzlich konnte anhand der erhobenen Daten zum PMI nicht sicher auf den Grad etwaiger Autolyse- und Fäulnisprozesse zurückgeschlossen werden. Sterbefälle mit jeweils identischem PMI konnten demnach unterschiedliche Fallkonstellationen aufweisen (bspw. Kühlung im Kühlraum bei konstant tiefen Temperaturen versus Wohnungsleiche mit unklaren Lagerungsbedingungen für einen identischen Zeitraum). Die regelhafte Kühlung von Leichnamen bei niedrigen Temperaturen dient der Verlangsamung autolytischer Vorgänge bzw. der Fäulnisprozesse. Entscheidend für die Untersuchung postmortaler Einflüsse auf die CSF-Zytologie erscheint demnach ebenfalls, in welchem Zeitintervall nach Todeseintritt, wie lange und unter welchen Bedingungen ein Leichnam aufbewahrt wurde. Angaben hierzu konnten für die Sterbefälle der vorliegenden Arbeit nicht erhoben werden und wurden deshalb zunächst nicht berücksichtigt. Inwieweit die postmortale Kühlung Autolyse und Fäulnis verlangsamt und wenn ja, in welchem Maße, oder ob es zu einem weitgehenden Stillstand dieser Prozesse kommt, kann demnach anhand der erhobenen Daten nicht abschließend beurteilt werden. Ein potenzieller Einfluss der postmortalen Leichenkühlung auf die Befunde erscheint in der Gesamtschau zumindest möglich, die Einberechnung der Leichenliegezeit unter Kühlung für weitere Untersuchungen mitunter ebenfalls sinnvoll. Eine alternative Definition des PMI wäre in diesem Zusammenhang demnach ebenfalls in Erwägung zu ziehen.

Zur direkten Untersuchung eines potenziellen Einflusses eines weiter fortschreitenden PMI auf die CSF-Zusammensetzung unter gleichbleibender Kühlung eines Leichnams wäre bspw. eine repetitive Entnahme von CSF an Verstorbenen in festgelegten Intervallen zu diskutieren. Vergleichende immunzytochemische Untersuchungen der Einzelproben wären potenziell geeignet, den Verlauf von Veränderungen der postmortalen Liquorzytologie und demnach ebenso Änderungen der postmortalen Mikroglia-Profildichte abbilden zu können. Weiterführende Untersuchungen könnten zudem prüfen, ob Unterschiede bezüglich der CSF-Zusammensetzung und Zytologie in Abhängigkeit der Entnahmestelle verifiziert werden können [66].

Inwiefern dem Übertritt der Mikroglia vom Hirnparenchym in die CSF passive oder aktive Prozesse zugrunde liegen, konnte anhand der Untersuchungsergebnisse der

postmortalen CSF zusammenfassend noch nicht hinreichend differenziert werden. Der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen der Mikroglia-Profildichte im Kortex und der der CSF spricht jedoch gegen einen ungerichteten Übertritt der Zellen im Rahmen postmortalen Prozesse. Aus den immunhistochemischen Untersuchungen ergaben sich Hinweise, die beide Alternativen potenziell denkbar erscheinen lassen. Potenzielle Zugangswege konnten im Bereich der Meningen und des zentralnervösen vaskulären Systems identifiziert werden und sollten in Erweiterung mit periventrikulären Hirnteilen, dem Ventrikependym sowie insbesondere in Bezug auf das Konzept des glymphatic pathway weiter untersucht werden.

4.6 Limitationen

Die der Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen umfassten bei einer gewählten Fallzahl von 15 Verstorbenen pro Gruppe ein Gesamtkollektiv von 60 Einzelfallbeispielen. Grundsätzlich ist damit die eingeschränkte Aussagekraft der Ergebnisse im Vergleich zu einem größer gewählten Umfang zu nennen. Die eingeschlossenen Fälle wurden im Vorfeld der Arbeit nicht selektiert, sondern lediglich anhand der Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung und deren Intensität in die vier Fallgruppen eingeteilt. Die Auswahl der Gruppenkriterien erfolgte willkürlich, eine alternative Gruppeneinteilung wäre in Zusammenschau mit den endgültigen Ergebnissen dieser Arbeit demnach denkbar. Die pro Fallbeispiel erhobenen Daten beschränkten sich auf die Parameter Todesursache, SEX, AGE, PMI, CPR, CSF-Intensität und BW. Weiterhin wurde der Einfluss dieser Faktoren lediglich in Bezug auf die Intensität der CSF-Färbung, nicht hingegen die Korrelation mit den Ergebnissen zur Dichte der Mikroglia-Profile im Hirnparenchym analysiert. Weiterführende Untersuchungen sollten, sofern möglich, vollständige Zusatzinformationen, insbesondere Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und Substanzmissbrauch, in die Auswertung miteinbeziehen und damit das Spektrum der potenziellen Einflussfaktoren auf die Ergebnisse in CSF und Hirnparenchym erweitern. Der Ausschluss etwaiger Störfaktoren in Bezug auf die Untersuchung einer akuten Reaktion der Mikroglia in allen drei Untersuchungsmedien erscheint bisweilen nur in solchen Fällen möglich, in denen es zu einem plötzlichen und sofortigen Todeseintritt gekommen sein mag und keine Vorerkrankungen vorlagen. Weiterhin konnten detaillierte Angaben zur Leichenaufbewahrung insbesondere im Hinblick auf den Zeitpunkt der

Leichenkühlung mangels limitierter zur Verfügung stehender Informationen nicht erhoben werden, sodass der Einfluss postmortaler Kühlung auf den Fortschritt von Autolyse und Fäulnis sowie deren Effekte auf die Mikroglia-Dichte nicht berücksichtigt werden konnten. Die asservierten Großhirn-Anteile wurden zwar für jeden der Einzelfälle in analogen Hirnregionen des frontalen bzw. parieto-okzipitalen Großhirnlappen entnommen, jedoch lassen diese anhand ihrer limitierten Größe nicht zwangsläufig Rückschluss auf andere Hirnareale zu. Gliale Reaktionen in alternativen Hirnregionen wurden damit potenziell nicht erfasst. Weiterhin wiesen die untersuchten Gewebeasservate keine Anteile des periventrikulären Markraumes oder Anschnitte des Ventrikelsystems auf. Gleichwohl sind potenzielle Unterschiede des immunhistochemischen Färbeprozesses zu beachten, die zu unterschiedlichen Intensitäten der Gyrianteile führen können. Ergänzende Untersuchungen unterschiedlicher Hirnregionen könnten demnach zur Aufklärung möglicher unterschiedlicher parenchymaler Reaktionsweisen der Mikroglia beitragen. Die durchgeführten Fixierungs- und Färbeprozesse führten weiterhin zu Veränderungen des behandelten Parenchyms. Schrumpfungsprozesse des Gewebes mit scheinbarer Erhöhung der Zelldichte konnten grundsätzlich als Störfaktor nicht ausgeschlossen werden. Ablösungen der Schnitte vom Objektträger führten in einigen Fällen zu intensiveren Färbungen in der Peripherie sowie zu Einrissen oder Verlust bestimmter Schnittanteile. Die Anfertigung von Dickschnitten wäre potenziell geeignet, die dreidimensionale Ausdehnung der Mikroglia insbesondere in den supragranulären Anteilen sowie im perivaskulären Parenchym besser abzubilden und die Hypothese zum Verlust der Zellfortsätze in diesen Bereichen zu bestätigen.

4.7 Ausblick

Durch die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen erscheint der zumindest abschnittsweise aktive Übertritt der Mikroglia aus dem Parenchym in die CSF sehr wahrscheinlich. Die Ergebnisse konnten einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem PMI widerlegen, sodass insbesondere die regelhafte Entnahme und die vergleichenden Untersuchungen von klinischen CSF-Proben lebender Patient:innen unter Berücksichtigung vielfältiger Krankheitsbilder hilfreich wäre, um den Zeitraum und die Bedingungen des Übertritts der Mikroglia in die CSF genauer definieren zu können. In ersten orientierenden Analysen klinischer CSF in Fällen von Subarachnoidalblutungen

konnten TMEM119-positive Mikroglia bereits erfolgreich identifiziert und so die Ergebnisse der Arbeit bestätigt werden, wonach der Nachweis von Mikroglia in der postmortalen CSF nicht das Resultat rein postmortalen Veränderungen darstellt (unpublizierte Daten). Die Analyse klinischer CSF bezüglich des Nachweises von Mikroglia könnte so ebenfalls in Bezug auf klinische und therapeutische Fragestellung Ergebnisse von erheblicher Relevanz erbringen. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Auswertung erscheinen dabei insbesondere die Untersuchung der CSF unter septischem Einfluss von besonderem Interesse, da speziell in diesen Fällen außerordentlich hohe Mikroglia-Dichten festgestellt werden konnten.

Um den potenziellen Einfluss der Leichenlagerung und insbesondere der Leichenkühlung bei gleichzeitig steigender PMI abzubilden, wäre die Analyse von solchen CSF-Proben in Betracht zu ziehen, die fallspezifisch in festgelegten regelmäßigen Intervallen unter gleichbleibenden Umgebungsbedingungen entnommen werden können. Im Hinblick auf die Morphologie und Verteilungsmuster der Mikroglia im Hirngewebe sind insbesondere ganzheitliche Untersuchungen des gesamten Gehirns bzw. der Vergleich einzelner zytoarchitektonisch abgrenzbarer Hirnareale vorzunehmen. Auffälligkeiten in Bezug auf eine perivaskuläre Anhäufung der Mikroglia der hier untersuchten Einzelfälle konnten hingegen durch ergänzende immunhistochemische Untersuchungen unter Zuhilfenahme des Mikroglia-Markers CD206 [23, 172] im Großhirnparenchym bereits bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen am postmortalen Hirngewebe und den korrespondierenden Proben postmortaler CSF konnten einen Zusammenhang der Dichte der parenchymalen TMEM119-positiven Mikroglia und der der CSF belegen. Innerhalb der analysierten Kompartimente bestehend aus Kortex, Marklager und CSF ergaben sich weit gefächerte Messwerte zur jeweiligen Dichte der immuno-positiven Mikroglia. Die Ergebnisse implizierten eine schnelle Reaktion der Mikroglia im Hirngewebe und einen zeitverzögerten Nachweis von immuno-positiven Mikroglia in der CSF. Signifikante Effekte von Alter, Geschlecht, Hirngewicht und insbesondere einem steigenden Postmortalintervall konnten als potenzielle Einflussfaktoren hinsichtlich der CSF-Intensität ausgeschlossen werden. Eine positive Korrelation ergab sich hingegen zwischen der Mikroglia-Dichte der CSF und den Angaben bezüglich erfolgter Reanimationsmaßnahmen der eingeschlossenen Sterbefälle als Hinweis auf einen relevanten Zusammenhang mit dem zerebralen Blutfluss.

Neben dem ursprünglich angestrebten isolierten Vergleich zwischen der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte der CSF, des Kortex und der des Markraums ergaben sich nach Analyse weiterhin morphologische Auffälligkeiten der identifizierten Mikroglia und teils spezifische Verteilungsmuster. Die abschnittsweise laminäre Anordnung der Zellen in den kortikalen Gewebeanteilen wies insbesondere in den supragranulären Schichten nahe der Hirnoberfläche strukturell auffällige Mikroglia-Profile mit annähernd rundem Zellkörper und wenigen bis keinen Zellfortsätzen auf. Ein annähernd identisches Bild konnte im perivaskulären Marklager festgestellt werden und wies auf einen Zusammenhang zum Übertritt der Mikroglia in die CSF sowie eine Assoziation zu den medullären Gefäßen hin. Der erstmalige Nachweis des aktiven Übertritts der TMEM119-positiven Mikroglia durch die weiche Hirnhaut implizierte einen aktiven Zugangsweg der Zellen in die CSF unter Ausbildung eines amöboid erscheinenden Phänotyps neben einem lediglich diffusen und passiven Übertritt der Zellen unter pathologischen Bedingungen.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen das enorme Potenzial der postmortalen CSF als Untersuchungsmedium insbesondere im Hinblick auf die Erhebung der Mikroglia-Dichte und die Analyse der Mikroglia-Morphologie in Bezug auf neuropathologische Beteiligung im ZNS und damit verbundenen Fragestellungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis* 36: 437-49. doi: 10.1007/s10545-013-9608-0
2. Adrian H, Mårten K, Salla N, Lasse V (2016) Biomarkers of Traumatic Brain Injury: Temporal Changes in Body Fluids. *eneuro* 3: ENEURO.0294-16.2016. doi: 10.1523/eneuro.0294-16.2016
3. Agoston DV, Shutes-David A, Peskind ER (2017) Biofluid biomarkers of traumatic brain injury. *Brain Inj* 31: 1195-203. doi: 10.1080/02699052.2017.1357836
4. Albargothy NJ, Johnston DA, MacGregor-Sharp M, Weller RO, Verma A, Hawkes CA, Carare RO (2018) Convective influx/lymphatic system: tracers injected into the CSF enter and leave the brain along separate periarterial basement membrane pathways. *Acta Neuropathol* 136: 139-52. doi: 10.1007/s00401-018-1862-7
5. Albargothy NJ, Sharp MM, Gatherer M, Morris A, Weller RO, Hawkes C, Carare RO (2017) Investigating the Lymphatic Drainage of the Brain: Essential Skills and Tools. *Methods Mol Biol* 1559: 343-65. doi: 10.1007/978-1-4939-6786-5_24
6. Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362: 181-5. doi: 10.1126/science.aat0473
7. Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145-52. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00113-3
8. Almulhim AM, Menezes RG. (2022) Evaluation of Postmortem Changes. StatPearls StatPearls Publishing LLC. Treasure Island (FL).
9. Arroyo A, Rosel P, Marron T (2005) Cerebrospinal fluid: postmortem biochemical study. *J Clin Forensic Med* 12: 153-6. doi: 10.1016/j.jcfm.2004.11.001
10. Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ (1999) Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 151-73. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.151
11. Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Delage CI, Tremblay M, Crespo-Lopez ME, Verkhatsky A (2022) Plasticity of microglia. *Biol Rev Camb Philos Soc* 97: 217-50. doi: 10.1111/brv.12797
12. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-41. doi: 10.1002/cne.21974
13. Bahney J, von Bartheld CS (2018) The Cellular Composition and Glia-Neuron Ratio in the Spinal Cord of a Human and a Nonhuman Primate: Comparison With Other Species and Brain Regions. *Anat Rec (Hoboken)* 301: 697-710. doi: 10.1002/ar.23728

14. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16: 1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016
15. Barron KD (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134 Suppl: 57-68. doi: 10.1016/0022-510x(95)00209-k
16. Bellver-Landete V, Bretheau F, Mailhot B, Vallières N, Lessard M, Janelle ME, Vernoux N, Tremblay M, Fuehrmann T, Shoichet MS, Lacroix S (2019) Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun* 10: 518. doi: 10.1038/s41467-019-08446-0
17. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1738-46. doi: 10.1073/pnas.1525528113
18. Benveniste H, Lee H, Volkow ND (2017) The Glymphatic Pathway: Waste Removal from the CNS via Cerebrospinal Fluid Transport. *Neuroscientist* 23: 454-65. doi: 10.1177/1073858417691030
19. Bisht K, Sharma K, Lacoste B, Tremblay M (2016) Dark microglia: Why are they dark? *Commun Integr Biol* 9: e1230575. doi: 10.1080/19420889.2016.1230575
20. Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Sánchez MG, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L, Branchi I, Maggi L, Limatola C, Butovsky O, Tremblay M (2016) Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 64: 826-39. doi: 10.1002/glia.22966
21. Blinkouskaya Y, Caçoilo A, Gollamudi T, Jalalian S, Weickenmeier J (2021) Brain aging mechanisms with mechanical manifestations. *Mech Ageing Dev* 200: 111575. doi: 10.1016/j.mad.2021.111575
22. Blinkouskaya Y, Weickenmeier J (2021) Brain Shape Changes Associated With Cerebral Atrophy in Healthy Aging and Alzheimer's Disease. *Front Mech Eng* 7. doi: 10.3389/fmech.2021.705653
23. Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 3-18. doi: 10.1111/nan.12011
24. Bohnert S, Georgiades K, Monoranu CM, Bohnert M, Büttner A, Ondruschka B (2021) Quantitative evidence of suppressed TMEM119 microglial immunohistochemistry in fatal morphine intoxications. *Int J Legal Med* 135: 2315-22. doi: 10.1007/s00414-021-02699-5
25. Bohnert S, Ondruschka B, Bohnert M, Schuhmann MK, Monoranu CM (2019) Post-mortem cerebrospinal fluid diagnostics: cytology and immunocytochemistry method suitable for routine use to interpret pathological processes in the central nervous system. *Int J Legal Med* 133: 1141-6. doi: 10.1007/s00414-019-02050-z

26. Bohnert S, Reinert C, Trella S, Schmitz W, Ondruschka B, Bohnert M (2021) Metabolomics in postmortem cerebrospinal fluid diagnostics: a state-of-the-art method to interpret central nervous system-related pathological processes. *Int J Legal Med* 135: 183-91. doi: 10.1007/s00414-020-02462-2
27. Bohnert S, Seiffert A, Trella S, Bohnert M, Distel L, Ondruschka B, Monoranu CM (2020) TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in postmortem examination. *Int J Legal Med* 134: 2167-76. doi: 10.1007/s00414-020-02384-z
28. Bohnert S, Trella S, Preiß U, Heinsen H, Bohnert M, Zwirner J, Tremblay M, Monoranu CM, Ondruschka B (2022) Density of TMEM119-positive microglial cells in postmortem cerebrospinal fluid as a surrogate marker for assessing complex neuropathological processes in the CNS. *Int J Legal Med* 136: 1841-50. doi: 10.1007/s00414-022-02863-5
29. Bohnert S, Wirth C, Schmitz W, Trella S, Monoranu CM, Ondruschka B, Bohnert M (2021) Myelin basic protein and neurofilament H in postmortem cerebrospinal fluid as surrogate markers of fatal traumatic brain injury. *Int J Legal Med* 135: 1525-35. doi: 10.1007/s00414-021-02606-y
30. Bonham LW, Sirkis DW, Yokoyama JS (2019) The Transcriptional Landscape of Microglial Genes in Aging and Neurodegenerative Disease. *Front Immunol* 10: 1170. doi: 10.3389/fimmu.2019.01170
31. Buchwalow IB, Böcker W. (2010) Background Staining, Autofluorescence and Blocking Steps. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 41-6.
32. Byard RW. (2020) Chapter 2 - Estimation of the time since death in the early postmortem period (24–48 hours). In: Hayman J, Oxenham M, eds. *Estimation of the Time since Death*. Academic Press. pp. 11-27.
33. Byard RW, Tsokos M (2013) The challenges presented by decomposition. *Forensic Sci Med Pathol* 9: 135-7. doi: 10.1007/s12024-012-9386-2
34. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM, Jurado Coronel JC, Capani F, Cardona-Gomez GP, Barreto GE (2014) Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 8: 211. doi: 10.3389/fncel.2014.00211
35. Canene-Adams K (2013) Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemistry. *Methods Enzymol* 533: 225-33. doi: 10.1016/b978-0-12-420067-8.00015-5
36. Carbonell WS, Murase S-I, Horwitz AF, Mandell JW (2005) Infiltrative microgliosis: activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. *J Neuroinflammation* 2: 5. doi: 10.1186/1742-2094-2-5
37. Castro LVG, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR (2022) Polarization of Microglia and Its Therapeutic Potential in Sepsis. *Int J Mol Sci* 23. doi: 10.3390/ijms23094925

38. Ceciliason A-S, Andersson MG, Nyberg S, Sandler H (2021) Histological quantification of decomposed human livers: a potential aid for estimation of the post-mortem interval? *Int J Legal Med* 135: 253-67. doi: 10.1007/s00414-020-02467-x
39. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11: 98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98
40. Colton C, Wilcock DM (2010) Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 174-91. doi: 10.2174/187152710791012053
41. Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ (2013) Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J Neurosci Res* 91: 1143-51. doi: 10.1002/jnr.23242
42. Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J (2018) The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron* 100: 375-88. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.022
43. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C (2014) Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? *Braz J Psychiatry* 36: 251-8. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1233
44. Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412
45. Davalos D, Akassoglou K, Cardona AE. (2020) Chapter 41 - Microglia. In: Rubenstein J, Rakic P, Chen B, Kwan KY, eds. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS (Second Edition)*. Academic Press. pp. 995-1020.
46. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8: 752-8. doi: 10.1038/nn1472
47. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34: 73-8. doi: 10.1016/0361-9230(94)90189-9
48. De-Giorgio F, Ciasca G, Fecondo G, Mazzini A, De Spirito M, Pascali VL (2021) Estimation of the time of death by measuring the variation of lateral cerebral ventricle volume and cerebrospinal fluid radiodensity using postmortem computed tomography. *Int J Legal Med* 135: 2615-23. doi: 10.1007/s00414-021-02698-6
49. Dekaban AS (1978) Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol* 4: 345-56. doi: 10.1002/ana.410040410
50. Dell'Aquila M, De Matteis A, Scatena A, Costantino A, Camporeale MC, De Filippis A (2021) Estimation of the time of death: where we are now? *Clin Ter* 172: 109-12. doi: 10.7417/ct.2021.2294
51. Dettmeyer RB. (2018) *Forensic Histopathology. Fundamentals and Perspectives*. 2nd ed. Springer Berlin

52. Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14: 1189-97. doi: 10.2174/092986707780597961
53. Doherty CM, Forbes RB (2014) Diagnostic Lumbar Puncture. *Ulster Med J* 83: 93-102.
54. Doughty D, Rajpurohit SK, Trang A, Alptekin A, Korkaya AK, Achyut BR, Arbab AS, Bradford JW (2022) Development of a novel purification protocol to isolate and identify brain microglia. *Exp Biol Med (Maywood)* 247: 1433-46. doi: 10.1177/15353702221096060
55. Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJL, Boddeke E (2018) The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Front Immunol* 9: 1753. doi: 10.3389/fimmu.2018.01753
56. Dubois LM, Perrault KA. (2020) Chapter 3 - Biochemical methods of estimating time since death. In: Hayman J, Oxenham M, eds. *Estimation of the Time since Death*. Academic Press. pp. 29-55.
57. Engelhardt B, Sorokin L (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31: 497-511. doi: 10.1007/s00281-009-0177-0
58. Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50: 477-86. doi: 10.1002/(sici)1097-4547(19971101)50:3<477::Aid-jnr14>3.0.Co;2-3
59. Fernández-Arjona MdM, León-Rodríguez A, López-Ávalos MD, Grondona JM (2021) Microglia activated by microbial neuraminidase contributes to ependymal cell death. *Fluids Barriers CNS* 18: 15. doi: 10.1186/s12987-021-00249-0
60. Finehout EJ, Franck Z, Relkin N, Lee KH (2006) Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval. *Clin Chem* 52: 1906-13. doi: 10.1373/clinchem.2006.070508
61. Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, Cao Y, Lee SH, Haddick PCG, Ngu H, Modrusan Z, Larson JL, Kaminker JS, van der Brug MP, Hansen DV (2018) Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep* 22: 832-47. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066
62. Frost JL, Schafer DP (2016) Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol* 26: 587-97. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.006
63. Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP (2011) Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2326-41. doi: 10.2741/3856
64. Garaschuk O (2017) Altersbedingte Veränderungen der Mikrogliazellen: ihre Rolle bei gesundem Altern des Gehirns und bei neurodegenerativen Erkrankungen. *e-Neuroforum* 23: 239-48. doi: doi:10.1515/nf-2016-0057
65. Garland J, Olds K, Rousseau G, Palmiere C, Ondruschka B, Kesha K, Glenn C, Morrow P, Stables S, Tse R (2020) Using vitreous humour and cerebrospinal fluid

electrolytes in estimating post-mortem interval - an exploratory study. *Aust J Forensic Sci* 52: 626-33. doi: 10.1080/00450618.2019.1642956

66. Garland J, Philcox W, Kesha K, Morrow P, Lam L, Spark A, Palmiere C, Elstub H, Cala AD, Stables S, Tse R (2018) Differences in Sampling Site on Postmortem Cerebrospinal Fluid Biochemistry: A Preliminary Study. *Am J Forensic Med Pathol* 39: 304-8. doi: 10.1097/paf.0000000000000420

67. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330: 841-5. doi: 10.1126/science.1194637

68. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7: 45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045

69. Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537

70. Goldstein M, Watkins S (2008) Immunohistochemistry. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 14: Unit 14.6. doi: 10.1002/0471142727.mb1406s81

71. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007

72. Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kündig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37: 1050-60. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.001

73. Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75: 388-97. doi: 10.1189/jlb.0303114

74. Hablitz LM, Nedergaard M (2021) The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology. *J Neurosci* 41: 7698. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0619-21.2021

75. Hammond TR, Robinton D, Stevens B (2018) Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34: 523-44. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060509

76. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387-94. doi: 10.1038/nn1997

77. Harry GJ, Kraft AD (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 33: 191-206. doi: 10.1016/j.neuro.2012.01.012

78. Hartmann P, Ramseier A, Gudat F, Mihatsch MJ, Polasek W (1994) Normal weight of the brain in adults in relation to age, sex, body height and weight. *Pathologe* 15: 165-70. doi: 10.1007/s002920050040

79. Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H (2019) Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun* 10: 5816. doi: 10.1038/s41467-019-13812-z
80. Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002) Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16: 2113-22. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02287.x
81. Hausmann R, Betz P (2000) The time course of the vascular response to human brain injury--an immunohistochemical study. *Int J Legal Med* 113: 288-92. doi: 10.1007/s004149900126
82. Hayman J, Oxenham M. (2020) Chapter 1 - Approaches to time since death estimation. In: Hayman J, Oxenham M, eds. *Estimation of the Time since Death*. Academic Press. pp. 1-9.
83. Henßge C (1979) Die Präzision von Todeszeitschätzungen durch die mathematische Beschreibung der rektalen Leichenabkühlung. *Z Rechtsmed* 83: 49-67. doi: 10.1007/BF00201311
84. Henßge C (1981) Todeszeitschätzungen durch die mathematische Beschreibung der rektalen Leichenabkühlung unter verschiedenen Abkühlungsbedingungen. *Z Rechtsmed* 87: 147-78. doi: 10.1007/BF00204763
85. Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Carrillo-Jiménez A, Oliva-Martín MJ, García-Revilla J, García-Quintanilla A, de Pablos RM, Venero JL (2015) Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 9: 312. doi: 10.3389/fncel.2015.00312
86. Hofmann K, Rodriguez-Rodriguez R, Gaebler A, Casals N, Scheller A, Kuerschner L (2017) Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. *Sci Rep* 7: 10779. doi: 10.1038/s41598-017-11103-5
87. Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, Wes PD, Möller T, Orre M, Kamphuis W, Hol EM, Boddeke EWGM, Eggen BJL (2015) Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun* 3: 31. doi: 10.1186/s40478-015-0203-5
88. Hubig M, Muggenthaler H, Sinicina I, Mall G (2015) Temperature based forensic death time estimation: The standard model in experimental test. *Leg Med* 17: 381-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.05.005>
89. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4: 147ra11. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748

90. Ishikawa T, Quan L, Michiue T, Kawamoto O, Wang Q, Chen JH, Zhu BL, Maeda H (2013) Postmortem catecholamine levels in pericardial and cerebrospinal fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Forensic Sci Int* 228: 52-60. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.02.008
91. Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1861-7. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.023
92. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M (2015) The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* 40: 2583-99. doi: 10.1007/s11064-015-1581-6
93. Jiang CT, Wu WF, Deng YH, Ge JW (2020) Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review). *Mol Med Rep* 21: 2006-18. doi: 10.3892/mmr.2020.11003
94. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ (2020) Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14: 198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198
95. Kalkman HO, Feuerbach D (2016) Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. *Pharmacol Ther* 163: 82-93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.001
96. Kernbach-Wighton G (2006) Möglichkeiten postmortal-biochemischer Diagnostik. *Rechtsmedizin* 16: 27-36. doi: 10.1007/s00194-005-0349-8
97. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
98. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77: 10-8. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023
99. Kim LH, Plaza K, Thomas SR, Draijer C, Radford K, Peters-Golden M, Mukherjee M, Nair P (2018) Endogenous peroxidases in sputum interfere with horse-radish peroxidase-based ELISAs. *J Immunol Methods* 454: 76-9. doi: 10.1016/j.jim.2017.11.005
100. Kodali M, Attaluri S, Madhu LN, Shuai B, Upadhya R, Gonzalez JJ, Rao X, Shetty AK (2021) Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus. *Aging Cell* 20: e13277. doi: 10.1111/accel.13277
101. Konishi H, Kobayashi M, Kunisawa T, Imai K, Sayo A, Malissen B, Crocker PR, Sato K, Kiyama H (2017) Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes. *Glia* 65: 1927-43. doi: 10.1002/glia.23204
102. Kopatz J, Beutner C, Welle K, Bodea LG, Reinhardt J, Claude J, Linnartz-Gerlach B, Neumann H (2013) Siglec-h on activated microglia for recognition and engulfment of glioma cells. *Glia* 61: 1122-33. doi: 10.1002/glia.22501

103. Kopkova A, Sana J, Machackova T, Vecera M, Radova L, Trachtova K, Vybihal V, Smrcka M, Kazda T, Slaby O, Fadrus P (2019) Cerebrospinal Fluid MicroRNA Signatures as Diagnostic Biomarkers in Brain Tumors. *Cancers (Basel)* 11. doi: 10.3390/cancers11101546
104. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-8. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7
105. Kumar A, Loane DJ (2012) Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 26: 1191-201. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.008
106. Lang G. (2013) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Springer Wien.
107. Langmann T (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81: 1345-51. doi: 10.1189/jlb.0207114
108. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-70. doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-w
109. Leyh J, Paeschke S, Mages B, Michalski D, Nowicki M, Bechmann I, Winter K (2021) Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front Cell Neurosci* 15: 701673. doi: 10.3389/fncel.2021.701673
110. Li C, Wang Q, Zhang Y, Lin H, Zhang J, Huang P, Wang Z (2016) Research progress in the estimation of the postmortem interval by Chinese forensic scholars. *Forensic Sci Res* 1: 3-13. doi: 10.1080/20961790.2016.1229377
111. Li DR, Michiue T, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Zhao D, Yoshida C, Chen JH, Wang Q, Komatsu A, Azuma Y, Maeda H (2009) Evaluation of postmortem S100B levels in the cerebrospinal fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)* 11 Suppl 1: S273-5. doi: 10.1016/j.legalmed.2009.02.042
112. Li Q, Barres BA (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18: 225-42. doi: 10.1038/nri.2017.125
113. Li Q, Lan X, Han X, Wang J (2018) Expression of Tmem119/Sall1 and Ccr2/CD69 in FACS-Sorted Microglia- and Monocyte/Macrophage-Enriched Cell Populations After Intracerebral Hemorrhage. *Front Cell Neurosci* 12: 520. doi: 10.3389/fncel.2018.00520
114. Lier J, Streit WJ, Bechmann I (2021) Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells* 10. doi: 10.3390/cells10092236
115. Lisi L, Ciotti GM, Braun D, Kalinin S, Currò D, Dello Russo C, Coli A, Mangiola A, Anile C, Feinstein DL, Navarra P (2017) Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci Lett* 645: 106-12. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.076

116. Liu CY, Wang X, Liu C, Zhang HL (2019) Pharmacological Targeting of Microglial Activation: New Therapeutic Approach. *Front Cell Neurosci* 13: 514. doi: 10.3389/fncel.2019.00514
117. Loane DJ, Kumar A (2016) Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 275: 316-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.018
118. Lopez-Atalaya JP, Askew KE, Sierra A, Gomez-Nicola D (2018) Development and maintenance of the brain's immune toolkit: Microglia and non-parenchymal brain macrophages. *Dev Neurobiol* 78: 561-79. doi: 10.1002/dneu.22545
119. Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7: 354-65. doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.014
120. Lyu J, Xie D, Bhatia TN, Leak RK, Hu X, Jiang X (2021) Microglial/Macrophage polarization and function in brain injury and repair after stroke. *CNS Neurosci Ther* 27: 515-27. doi: 10.1111/cns.13620
121. Madaniyazi L, Armstrong B, Chung Y, Ng CFS, Seposo X, Kim Y, Tobias A, Guo Y, Sera F, Honda Y, Gasparrini A, Hashizume M, Network tM-CM-CCR (2021) Seasonal variation in mortality and the role of temperature: a multi-country multi-city study. *Int J Epidemiol* 51: 122-33. doi: 10.1093/ije/dyab143
122. Madea B (2009) Sudden death, especially in infancy--improvement of diagnoses by biochemistry, immunohistochemistry and molecular pathology. *Leg Med (Tokyo)* 11 Suppl 1: S36-42. doi: 10.1016/j.legalmed.2009.01.111
123. Mai JK, Paxinos G. (2011) The human nervous system. Academic press.
124. Mall G, Eisenmenger W (2005) Estimation of time since death by heat-flow Finite-Element model part II: application to non-standard cooling conditions and preliminary results in practical casework. *Leg Med* 7: 69-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2004.06.007>
125. Mall G, Eisenmenger W (2005) Estimation of time since death by heat-flow Finite-Element model. Part I: method, model, calibration and validation. *Leg Med* 7: 1-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2004.06.006>
126. Maurya SK, Bhattacharya N, Mishra S, Bhattacharya A, Banerjee P, Senapati S, Mishra R (2021) Microglia Specific Drug Targeting Using Natural Products for the Regulation of Redox Imbalance in Neurodegeneration. *Front Pharmacol* 12: 654489. doi: 10.3389/fphar.2021.654489
127. Mercurio D, Fumagalli S, Schafer MK, Pedragosa J, Ngassam LDC, Wilhelmi V, Winterberg S, Planas AM, Weihe E, De Simoni MG (2022) Protein Expression of the Microglial Marker Tmem119 Decreases in Association With Morphological Changes and Location in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci* 16: 820127. doi: 10.3389/fncel.2022.820127
128. Miyata S (2022) Glial functions in the blood-brain communication at the circumventricular organs. *Front Neurosci* 16: 991779. doi: 10.3389/fnins.2022.991779

129. Mizee MR, Miedema SS, van der Poel M, Adelia, Schuurman KG, van Strien ME, Melief J, Smolders J, Hendrickx DA, Heutinck KM, Hamann J, Huitinga I (2017) Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathol Commun* 5: 16. doi: 10.1186/s40478-017-0418-8
130. Mondo E, Becker SC, Kautzman AG, Schifferer M, Baer CE, Chen J, Huang EJ, Simons M, Schafer DP (2020) A Developmental Analysis of Juxtavascular Microglia Dynamics and Interactions with the Vasculature. *J Neurosci* 40: 6503-21. doi: 10.1523/jneurosci.3006-19.2020
131. Moraes CA, Zaverucha-do-Valle C, Fleurance R, Sharshar T, Bozza FA, d'Avila JC (2021) Neuroinflammation in Sepsis: Molecular Pathways of Microglia Activation. *Pharmaceuticals (Basel)* 14. doi: 10.3390/ph14050416
132. Mori S, Leblond CP (1969) Identification of microglia in light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 135: 57-80. doi: 10.1002/cne.901350104
133. Morris JA, Harrison LM, Telford DR (2012) Postmortem cerebrospinal fluid pleocytosis: a marker of inflammation or postmortem artifact? *Int J Pediatr* 2012: 964074. doi: 10.1155/2012/964074
134. Muggenthaler H, Sinicina I, Hubig M, Mall G (2012) Database of post-mortem rectal cooling cases under strictly controlled conditions: a useful tool in death time estimation. *Int J Legal Med* 126: 79-87. doi: 10.1007/s00414-011-0573-6
135. Musshoff F, Menting T, Madea B (2004) Postmortem serotonin (5-HT) concentrations in the cerebrospinal fluid of medicolegal cases. *Forensic Sci Int* 142: 211-9. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.02.023
136. Napoli I, Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158: 1030-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.046
137. Natale G, Limanaqi F, Busceti CL, Mastroiacovo F, Nicoletti F, Puglisi-Allegra S, Fornai F (2021) Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration From Periphery to CNS. *Front Neurosci* 15: 639140. doi: 10.3389/fnins.2021.639140
138. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. (2008) *The Human Central Nervous System*. 4th ed. Springer Berlin.
139. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-8. doi: 10.1126/science.1110647
140. Norris GT, Kipnis J (2019) Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *J Exp Med* 216: 60-70. doi: 10.1084/jem.20180199
141. Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW (2011) Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10: 108-18. doi: 10.2174/187152711794488575
142. Ondruschka B, Pohlert D, Sommer G, Schober K, Teupser D, Franke H, Dressler J (2013) S100B and NSE as useful postmortem biochemical markers of traumatic brain injury in autopsy cases. *J Neurotrauma* 30: 1862-71. doi: 10.1089/neu.2013.2895

143. Ondruschka B, Sieber M, Kirsten H, Franke H, Dreßler J (2018) Measurement of Cerebral Biomarkers Proving Traumatic Brain Injuries in Post-Mortem Body Fluids. *J Neurotrauma* 35: 2044-55. doi: 10.1089/neu.2017.5441
144. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173: 649-65. doi: 10.1111/bph.13139
145. Oura P (2022) Seasonal variation in medico-legal autopsies in Finland-a nationwide analysis of the period 2016-2021. *Int J Legal Med*. doi: 10.1007/s00414-022-02880-4
146. Palmiere C, Mangin P (2012) Postmortem chemistry update part II. *Int J Legal Med* 126: 199-215. doi: 10.1007/s00414-011-0614-1
147. Palmiere C, Vanhaebost J, Ventura F, Bonsignore A, Bonetti LR (2015) Cerebrospinal fluid PCR analysis and biochemistry in bodies with severe decomposition. *J Forensic Leg Med* 30: 21-4. doi: 10.1016/j.jflm.2014.12.012
148. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay ME, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E, Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schaefer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai LH, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu LJ, Wyss-Coray T (2022) Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110: 3458-83. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020
149. Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273-7. doi: 10.1016/0166-2236(88)90110-5
150. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6: 193-201. doi: 10.1038/nrneurol.2010.17
151. Perry VH, Teeling J (2013) Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol* 35: 601-12. doi: 10.1007/s00281-013-0382-8
152. Peters R (2006) Ageing and the brain. *Postgrad Med J* 82: 84-8. doi: 10.1136/pgmj.2005.036665
153. Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Deshmukh A, Sullivan E (2001) Sex differences in the effects of alcohol on brain structure. *Am J Psychiatry* 158: 188-97. doi: 10.1176/appi.ajp.158.2.188

154. Platt MS, McClure S, Clarke R, Spitz WU, Cox W (1989) Postmortem cerebrospinal fluid pleocytosis. *Am J Forensic Med Pathol* 10: 209-12. doi: 10.1097/00000433-198909000-00007
155. Plog BA, Nedergaard M (2018) The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol* 13: 379-94. doi: 10.1146/annurev-pathol-051217-111018
156. Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7: 1356-61. doi: 10.1038/nm1201-1356
157. Qian L, Flood PM (2008) Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunol Res* 41: 155. doi: 10.1007/s12026-008-8018-0
158. Quan L, Ishikawa T, Hara J, Michiue T, Chen JH, Wang Q, Zhu BL, Maeda H (2011) Postmortem serotonin levels in cerebrospinal and pericardial fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)* 13: 75-8. doi: 10.1016/j.legalmed.2010.11.003
159. Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28: 571-3. doi: 10.1016/j.tins.2005.09.001
160. Ramos-Vara JA (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405
161. Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19: 987-91. doi: 10.1038/nn.4338
162. Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528
163. Ratner V, Gao Y, Lee H, Elkin R, Nedergaard M, Benveniste H, Tannenbaum A (2017) Cerebrospinal and interstitial fluid transport via the glymphatic pathway modeled by optimal mass transport. *Neuroimage* 152: 530-7. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.03.021
164. Réu P, Khosravi A, Bernard S, Mold JE, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2017) The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep* 20: 779-84. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.004
165. Ruan C, Elyaman W (2022) A New Understanding of TMEM119 as a Marker of Microglia. *Front Cell Neurosci* 16: 902372. doi: 10.3389/fncel.2022.902372
166. Ruprecht K, Tumani H (2016) Cerebrospinal fluid diagnostics in multiple sclerosis. *Nervenarzt* 87: 1282-7. doi: 10.1007/s00115-016-0220-z
167. Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11: 775-87. doi: 10.1038/nri3086

168. Salerno M, Cocimano G, Rocuzzo S, Russo I, Piombino-Mascali D, Márquez-Grant N, Zammit C, Esposito M, Sessa F (2022) New Trends in Immunohistochemical Methods to Estimate the Time since Death: A Review. *Diagnostics (Basel)* 12. doi: 10.3390/diagnostics12092114
169. Salter MW, Beggs S (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158: 15-24. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.008
170. Samorajski T (1976) How the human brain responds to aging. *J Am Geriatr Soc* 24: 4-11. doi: 10.1111/j.1532-5415.1976.tb03246.x
171. Sangwan A, Singh SP, Singh P, Gupta OP, Manas A, Gupta S (2021) Role of molecular techniques in PMI estimation: An update. *J Forensic Leg Med* 83: 102251. doi: 10.1016/j.jflm.2021.102251
172. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y (2016) TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 36: 39-49. doi: 10.1111/neup.12235
173. Savage JC, Carrier M, Tremblay M (2019) Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol* 2034: 13-26. doi: 10.1007/978-1-4939-9658-2_2
174. Scholz W. (1957) Für die allgemeine Histopathologie degenerativer Prozesse bedeutsame morphologische, histochemische und strukturphysiologische Daten. In: Bodechtel G, Von Braunmühl A, Cobb S, Eicke WJ, Erbslöh F, Friedrich G, Hallervorden J, Haymaker W, Jacob H, Krauland W, Lindenberg R, Lüers T, Meessen H, Noetzel H, Nordmann M, Reichardt M, Scholz W, Spatz H, Stochdorph O, Strughold H, Ule G, Walthard B, Walthard KM, eds. *Erkrankungen des zentralen Nervensystems I*. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg. pp. 42-265.
175. Sekino N, Selim M, Shehadah A (2022) Sepsis-associated brain injury: underlying mechanisms and potential therapeutic strategies for acute and long-term cognitive impairments. *J Neuroinflammation* 19: 101. doi: 10.1186/s12974-022-02464-4
176. Shaerzadeh F, Streit WJ, Heysieattalab S, Khoshbouei H (2018) Methamphetamine neurotoxicity, microglia, and neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 15: 341. doi: 10.1186/s12974-018-1385-0
177. Shi Y, Cui M, Ochs K, Brendel M, Strübing FL, Briel N, Eckenweber F, Zou C, Banati RB, Liu GJ, Middleton RJ, Rupprecht R, Rudolph U, Zeilhofer HU, Rammes G, Herms J, Dorostkar MM (2022) Long-term diazepam treatment enhances microglial spine engulfment and impairs cognitive performance via the mitochondrial 18 kDa translocator protein (TSPO). *Nat Neurosci* 25: 317-29. doi: 10.1038/s41593-022-01013-9
178. Shkrum MJ, Ramsay DA. (2007) Postmortem Changes. *Forensic Pathology of Trauma: Common Problems for the Pathologist*. Humana Press Totowa, NJ. pp. 23-64.
179. Sieber M, Dreßler J, Franke H, Pohlers D, Ondruschka B (2018) Post-mortem biochemistry of NSE and S100B: A supplemental tool for detecting a lethal traumatic brain injury? *J Forensic Leg Med* 55: 65-73. doi: 10.1016/j.jflm.2018.02.016

180. Sousa AM, Meyer KA, Santpere G, Gulden FO, Sestan N (2017) Evolution of the human nervous system function, structure, and development. *Cell* 170.
181. St-Pierre MK, Šimončíčová E, Bögi E, Tremblay M (2020) Shedding Light on the Dark Side of the Microglia. *ASN Neuro* 12: 1759091420925335. doi: 10.1177/1759091420925335
182. Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233-47. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00083-5
183. Stratoulis V, Venero JL, Tremblay M, Joseph B (2019) Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J* 38: e101997. doi: 10.15252/embj.2019101997
184. Streefkerk JG (1972) Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem* 20: 829-31. doi: 10.1177/20.10.829
185. Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-9. doi: 10.1002/glia.10154
186. Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immune system. *Sci Am* 273: 54-5, 8-61. doi: 10.1038/scientificamerican1195-54
187. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B (1997) Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol* 94: 345-52. doi: 10.1007/s004010050717
188. Swain R, Kumar A, Sahoo J, Lakshmy R, Gupta SK, Bhardwaj DN, Pandey RM (2015) Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *J Forensic Leg Med* 36: 144-8. doi: 10.1016/j.jflm.2015.09.017
189. Sweis R, Ortiz J, Biller J (2016) Neurology of Sepsis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16: 21. doi: 10.1007/s11910-016-0623-z
190. Tan Y-L, Yuan Y, Tian L (2020) Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 25: 351-67. doi: 10.1038/s41380-019-0609-8
191. Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53: 1181-94. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5
192. Tauber SC, Djukic M, Gossner J, Eiffert H, Brück W, Nau R (2021) Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 19: 215-31. doi: 10.1080/14787210.2020.1812384
193. Tominaga M, Michiue T, Ishikawa T, Inamori-Kawamoto O, Oritani S, Maeda H (2015) Evaluation of postmortem drug concentrations in cerebrospinal fluid compared with blood and pericardial fluid. *Forensic Sci Int* 254: 118-25. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.07.005

194. Tőro K, Dunay G, Bartholy J, Pongrácz R, Kis Z, Keller E (2009) Relationship between suicidal cases and meteorological conditions. *J Forensic Leg Med* 16: 277-9. doi: 10.1016/j.jflm.2008.12.015
195. Tremblay M, Marker DF, Puccini JM, Muly EC, Lu SM, Gelbard HA (2013) Ultrastructure of microglia-synapse interactions in the HIV-1 Tat-injected murine central nervous system. *Commun Integr Biol* 6: e27670. doi: 10.4161/cib.27670
196. Tremblay ME, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhatsky A (2020) Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. *Front Cell Neurosci* 14: 592214. doi: 10.3389/fncel.2020.592214
197. Tremblay ME, Majewska AK (2011) A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun Integr Biol* 4: 220-2. doi: 10.4161/cib.4.2.14506
198. Tsutsumi Y (2021) Pitfalls and Caveats in Applying Chromogenic Immunostaining to Histopathological Diagnosis. *Cells* 10. doi: 10.3390/cells10061501
199. Tumani H, Uhr M, Wildemann B, Wick M (2016) Importance of cerebrospinal fluid diagnostics in neuropsychiatric diseases. *Nervenarzt* 87: 1259-60. doi: 10.1007/s00115-016-0240-8
200. Ueno M, Chiba Y, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R (2016) Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. *Brain Tumor Pathol* 33: 89-96. doi: 10.1007/s10014-016-0255-7
201. Uff C, Yip P (2022) Advances in Visualizing Microglial Cells in Human Central Nervous System Tissue. *Biomolecules* 12. doi: 10.3390/biom12050603
202. Uhr M, Tumani H, Lange P (2016) Strategien der Liquorbefundung – integrierter Befundbericht. *Nervenarzt* 87: 1271-5. doi: 10.1007/s00115-016-0232-8
203. v. Sántha K (1932) Untersuchungen über die Entwicklung der Horte gaschen Mikroglia. *Arch Psychiatr Nervenkr* 96: 36-67. doi: 10.1007/BF02064322
204. Vankriekelsvenne E, Chrzanowski U, Manzhula K, Greiner T, Wree A, Hawlitschka A, Llovera G, Zhan J, Joost S, Schmitz C, Ponsaerts P, Amor S, Nutma E, Kipp M, Kaddatz H (2022) Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. *Glia* 70: 1170-90. doi: 10.1002/glia.24164
205. Vass AA (2011) The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic Sci Int* 204: 34-40. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.052
206. Wang J, Wang J, Wang J, Yang B, Weng Q, He Q (2019) Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol* 10. doi: 10.3389/fphar.2019.00286
207. Wang KK, Yang Z, Zhu T, Shi Y, Rubenstein R, Tyndall JA, Manley GT (2018) An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn* 18: 165-80. doi: 10.1080/14737159.2018.1428089

208. Warden AS, Triplett TA, Lyu A, Grantham EK, Azzam MM, DaCosta A, Mason S, Blednov YA, Ehrlich LIR, Mayfield RD, Harris RA (2021) Microglia depletion and alcohol: Transcriptome and behavioral profiles. *Addict Biol* 26: e12889. doi: 10.1111/adb.12889
209. Wardlaw JM, Benveniste H, Nedergaard M, Zlokovic BV, Mestre H, Lee H, Doubal FN, Brown R, Ramirez J, MacIntosh BJ, Tannenbaum A, Ballerini L, Rungta RL, Boido D, Sweeney M, Montagne A, Charpak S, Joutel A, Smith KJ, Black SE, colleagues from the Fondation Leducq Transatlantic Network of Excellence on the Role of the Perivascular Space in Cerebral Small Vessel D (2020) Perivascular spaces in the brain: anatomy, physiology and pathology. *Nat Rev Neurol* 16: 137-53. doi: 10.1038/s41582-020-0312-z
210. Wei W, Michu Q, Wenjuan D, Jianrong W, Zhibing H, Ming Y, Bo J, Xia L (2020) Histological changes in human skin 32 days after death and the potential forensic significance. *Sci Rep* 10: 18753. doi: 10.1038/s41598-020-76040-2
211. Wendimu MY, Hooks SB (2022) Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11132091
212. Witelson SF, Beresh H, Kigar DL (2006) Intelligence and brain size in 100 postmortem brains: sex, lateralization and age factors. *Brain* 129: 386-98. doi: 10.1093/brain/awh696
213. Wyler D, Marty W, Bar W (1994) Correlation between the post-mortem cell content of cerebrospinal fluid and time of death. *Int J Legal Med* 106: 194-9. doi: 10.1007/bf01371336
214. Xu E, Liu J, Liu H, Wang X, Xiong H (2017) Role of microglia in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 9: 84-100.
215. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40: 274-88. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006
216. Yokobori S, Hosein K, Burks S, Sharma I, Gajavelli S, Bullock R (2013) Biomarkers for the clinical differential diagnosis in traumatic brain injury--a systematic review. *CNS Neurosci Ther* 19: 556-65. doi: 10.1111/cns.12127
217. Young KF, Gardner R, Sariana V, Whitman SA, Bartlett MJ, Falk T, Morrison HW (2021) Can quantifying morphology and TMEM119 expression distinguish between microglia and infiltrating macrophages after ischemic stroke and reperfusion in male and female mice? *J Neuroinflammation* 18: 58. doi: 10.1186/s12974-021-02105-2
218. Zappaterra MW, Lehtinen MK (2012) The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci* 69: 2863-78. doi: 10.1007/s00018-012-0957-x
219. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K (2013) Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol* 9: 201-10. doi: 10.1038/nrneurol.2013.9

220. Zotova E, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D (2011) Microglial alterations in human Alzheimer's disease following Abeta42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37: 513-24. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01156.x
221. Zrzavy T, Hoftberger R, Berger T, Rauschka H, Butovsky O, Weiner H, Lassmann H (2019) Pro-inflammatory activation of microglia in the brain of patients with sepsis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 45: 278-90. doi: 10.1111/nan.12502
222. Zwirner J, Anders S, Bohnert S, Burkhardt R, Da Broi U, Hammer N, Pohlert D, Tse R, Ondruschka B (2021) Screening for Fatal Traumatic Brain Injuries in Cerebrospinal Fluid Using Blood-Validated CK and CK-MB Immunoassays. *Biomolecules* 11. doi: 10.3390/biom11071061
223. Zwirner J, Bohnert S, Franke H, Garland J, Hammer N, Möbius D, Tse R, Ondruschka B (2021) Assessing Protein Biomarkers to Detect Lethal Acute Traumatic Brain Injuries in Cerebrospinal Fluid. *Biomolecules* 11. doi: 10.3390/biom11111577
224. Zwirner J, Kulakofsky R, Fitzek A, Schröder AS, Bohnert S, Franke H, Renné T, Tse R, Ondruschka B (2022) Forensic biomarkers of lethal traumatic brain injury. *Int J Legal Med* 136: 871-86. doi: 10.1007/s00414-022-02785-2

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	<i>Grad Celsius</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
a. e.	<i>am ehesten</i>
ad	<i>zu</i>
AEC	<i>3-Amino-9-ethylcarbazol</i>
AGE	<i>Alter</i>
ANOVA	<i>einfaktorielle Varianzanalyse</i>
Aqua bidest.	<i>zweifach destilliertes Wasser</i>
Aqua dest.	<i>destilliertes Wasser</i>
Arg1	<i>Arginase 1</i>
BBB	<i>blood brain barrier, Blut-Hirn-Schranke</i>
BCSFB	<i>blood-cerebrospinal fluid barrier, Blut-Liquor-Schranke</i>
bspw.	<i>beispielsweise</i>
BW	<i>brain weight, Gehirngewicht</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CPR	<i>cardiopulmonary resuscitation, Reanimation</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid, Liquor cerebrospinalis</i>
CVO	<i>circumventricular organ, zirkumventrikuläres Organ</i>
CX ₃ CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
et al.	<i>et alii</i>
FFPE	<i>formalinfixiert und Paraffin-eingebettet</i>
g	<i>Gramm</i>
ggf.	<i>gegebenenfalls</i>
HCl	<i>Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase</i>
IBA-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IGF-I	<i>insuline-like growth factor 1</i>
iNOS	<i>induzierbare NO-Synthase</i>
ISF	<i>interstitielle Flüssigkeit</i>
ITT	<i>isolated thoracic trauma</i>
JPEG	<i>Bildformat der Joint Photographic Experts Group</i>
k. A.	<i>keine Angabe</i>
LC/MS	<i>Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
m	<i>männlich</i>
min	<i>Minute, Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MOV	<i>Multiorganversagen</i>
MPS	<i>mononukleäres-phagozytäres System</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid, Kochsalz</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid, Natronlauge</i>
OBIF	<i>osteoblast induction factor</i>
PMI	<i>Postmortalintervall</i>
PNS	<i>peripheres Nervensystem</i>

RAW	<i>Rohdatenformat einer Bilddatei</i>
RHS	<i>retikulohistiozytäres System</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SEX	<i>Geschlecht</i>
SHT	<i>Schädel-Hirn-Trauma</i>
Siglec-H	<i>sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin-h</i>
sog.	<i>sogenannt</i>
TBI	<i>traumatic brain injury</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TIF	<i>Tagged Image File Format</i>
TMEM119	<i>transmembrane protein 119</i>
TRIS	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
w	<i>weiblich</i>
y	<i>year, Jahr</i>
z. B.	<i>zum Beispiel</i>
Z. n.	<i>Zustand nach</i>
ZNS	<i>zentrales Nervensystem</i>
ZRV	<i>zentrales Regulationsversagen</i>

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufnahmelokalisation der fünf einzelnen Lichtbilder pro jeweiligem CSF-Zytospin	36
Abbildung 2: Geschlechterverhältnis innerhalb der vier Fallgruppen	37
Abbildung 3: Quantitative Verteilung der final festgelegten Todesursachen der einzelnen Sterbefälle in Todesursachenkategorien.....	38
Abbildung 4: Mittelwerte der PMI der einzelnen Fallgruppen.....	39
Abbildung 5: Angaben zur CPR der einzelnen Fallgruppen.....	40
Abbildung 6: Aufnahmen von Paraffinschnitten des Isokortex zweier exemplarischer Fälle nach immunhistochemischer Färbung mit TMEM119 unter Vergrößerung	46
Abbildung 7: Aufnahme der äußeren Kortexanteile (Lamina I) mit Subarachnoidalraum unter Vergrößerung.....	49
Abbildung 8: Aufnahme der äußeren Kortexanteile mit Pia mater unter Vergrößerung	50
Abbildung 9: Aufnahme des Marklagers mit tangenialem Anschnitt eines Gefäßes und umliegender Mikroglia unter Vergrößerung.....	51
Abbildung 10: Übersichtsaufnahme eines exemplarischen CSF-Zytospins bei geringer Vergrößerung nach immunzytochemischer Färbung mit TMEM119.....	53
Abbildung 11: Korrelation zwischen der kortikalen Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile und der Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in der CSF; statistisch signifikant.	59
Abbildung 12: Korrelation zwischen der kortikalen Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile und der medullären Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile; statistisch signifikant.....	60
Abbildung 13: Korrelation zwischen der medullären Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile und der Dichte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profile in der CSF; statistisch nicht signifikant.	60
Abbildung 14: Heatmap mit Korrelationen der untersuchten Parameter mit der CSF-Intensität.....	61

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Fallgruppen anhand der TMEM119-positiven Zellprofile in der CSF	24
Tabelle 2: Herstellerinformationen zum Anti-TMEM119-Antikörper	29
Tabelle 3: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "stark positiv"	41
Tabelle 4: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "positiv"	42
Tabelle 5: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "schwach bis negativ"	43
Tabelle 6: Erhobene Parameter zur Fallgruppe "negativ"	44
Tabelle 7: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „stark positiv“	55
Tabelle 8: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „positiv“	56
Tabelle 9: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „schwach bis negativ“	56
Tabelle 10: Ermittelte Werte der TMEM119-positiven Mikroglia-Profildichte in Hirnrinde, Marklager und CSF-Zytospin der Fallgruppe „negativ“	57

IV. Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Chef Herrn Prof. Dr. med. Michael Bohnert, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg, für die Möglichkeit, meiner Leidenschaft für das Fach der Rechtsmedizin nachgehen und diese Arbeit in diesem Umfang durchgeführt haben zu können sowie für die Geduld und Unterstützung während der vergangenen Jahre im Studium und im Berufsleben.

Frau Dr. med. Dipl.-Biol. Simone Bohnert, ebenfalls aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg, gilt mein liebevoller Dank für die Einführung in das spannende Thema der postmortalen Liquordiagnostik sowie der Mikroglia, die Möglichkeit, diese Arbeit durchgeführt haben zu können und ihre fachliche sowie mentale Unterstützung und Betreuung, die sich mit der Zeit in eine Freundschaft gewandelt hat.

Ebenfalls danke ich herzlichst Frau Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu und ihrem Team Frau Hartmann, Frau Herud und Frau Schraut aus der Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg für die unzähligen schönen Stunden im Labor sowie die Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der Färbungen. Dem Liquorlabor der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die zuverlässige Herstellung der Zytospins.

Mein großer Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. med. Benjamin Ondruschka, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die professionelle Durchführung der statistischen Auswertungen, die Hilfestellung und gemeinsame Interpretation der Ergebnisse und das Zurverfügungstellen der Analysen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Helmut Heinsen für die außerordentliche Hilfe im Hinblick auf die Erstellung der Übersichtsaufnahmen, den neuropathologischen Auswertungen der Hirnschnitte sowie die Bereitstellung der Grafiken und den zugehörigen Ergebnissen meinen großen Dank ausdrücken.

Meinen Dank verdienen nicht zuletzt Herr Heiko Besenfelder und Herr Max Perschneck vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg für die sorgfältige Asservierung der zahlreichen Liquorproben.

Mein abschließender und besonderer Dank gilt meiner Familie für den immerwährenden Rückhalt sowie insbesondere Harald Kraschina, Angela Jelitto und Benjamin Erlebach für die tatkräftige Unterstützung bei Durchsicht dieser Arbeit. Der größte Dank gebührt meinen Eltern, Anita und Peter Trella, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung mein Studium sowie die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wären. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

V. Lebenslauf

geboren	1984
geb. Ort	Schwedt, Pommern
geb. Eltern	Christoph Heise Christa Heise
geb. Geburtsdatum und -ort	17. 10. 1984 in Schwedt, Deutschland
geb. Bildungsweg	
geb. 2002-2006	Assistentenstelle in Weiterbildung Institut für Hochschulen, Universität Würzburg
geb. 2006-2007	Teilnahme an Workshops „Hilf mir, meine Ziele zu erreichen“ und „Kritik und Feedback“
geb. 2007-2011	Teilnahme an Workshops „SPAM in Psychologie“ (Angewandte / Kommunikationspsychologie) (München)
geb. 2011-2012	Teilnahme an Workshops „Kritik und Feedback“ (München) und „Kommunikation in der Medizin“ (Frankfurt am Main)
geb. 2012-2013	Teilnahme an Workshops „Kritik und Feedback“ (München)
geb. 2013-2016	Studienassistentin Institut für Psychologie, Universität Würzburg
geb. 2017-2020	Abschulung Pädagogisch-psychologische Schwerpunktklasse, Dr. Schulz und Dr. Schneider Würzburg
geb. 2020-2021	
geb. 2021-2022	Studium des Humanstudiums an der Universität Würzburg
geb. 2022-2023	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
geb. 2023-2024	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
geb. 2024-2025	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
geb. 2025-2026	Allgemeine Hochschulreife Gemeinschaftshaus-Gymnasium, Schwedt
geb. 2026-2027	2027: Abgabedatum

Dr. Heise

Unterschrift

VI. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Publikationsverzeichnis:

2023 Bohnert S, Trella S, Stock B, Preiß U, Doberentz E, Heinsen H, Bohnert M (2023) Eine tödlich endende Fahrt zu einem Sommerkonzert. Arch Kriminol 251: 20-31

2022 Zander C, Trella S, Tatschner T, Bohnert M (2022) Tod durchs Schlüsselloch - Zur Kasuistik der Keyhole Lesion. Arch Kriminol 250: 180-188

Bohnert S, Trella S, Preiß U, Heinsen H, Bohnert M, Zwirner J, Tremblay ME, Monoranu CM, Ondruschka B (2022) Density of TMEM119-positive microglial cells in postmortem cerebrospinal fluid as a surrogate marker for assessing complex neuropathological processes in the CNS. Int J Legal Med 136: 1841-1850

2021 Bohnert S, Wirth C, Schmitz W, Trella S, Monoranu CM, Ondruschka B, Bohnert M (2021) Myelin basic protein and neurofilament H in postmortem cerebrospinal fluid as surrogate markers of fatal traumatic brain injury. Int J Legal Med 135: 1525-1535

Bohnert S, Reinert C, Trella S, Schmitz W, Ondruschka B, Bohnert M (2021) Metabolomics in post mortem cerebrospinal fluid diagnostics: A state-of-the-art method to interpret central nervous system-related pathological processes. Int J Legal Med 135: 183-191

Ahrens S, Trella S, Bohnert M (2021) Die zerstückelte Wasserleiche. Arch Kriminol 247: 157-164

2020 Bohnert S, Seiffert A, Trella S, Bohnert M, Distel L, Ondruschka B, Monoranu CM (2020) TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in post mortem examination. Int J Legal Med 134: 2167-2176

Kongressteilnahme:

08/2022 Aktive Teilnahme an der 101. Internationalen Jahrestagung der DGRM (Lugano), eigener Vortrag:

Trella S, Heinsen H, Monoranu CM, Ondruschka B, Bohnert M, Bohnert S (2022) Die Farbe postmortalen Liquors (Conference Paper)

08/2022 Mitarbeit an Vortragsthemen zur 101. Internationalen Jahrestagung der DGRM (Lugano):

Bohnert S, Reinert C, Schmitz W, Trella S, Heinsen H, Monoranu CM, Ondruschka B, Bohnert M (2022) Neuroforensomics: endogene Stoffwechselprodukte im Liquor cerebrospinalis als Biomarker von neuropathologischen Abläufen des menschlichen zentralen Nervensystems (Conference Paper)

Bohnert S, Trella S, Preiß U, Monoranu CM, Ondruschka B, Bohnert M, Heinsen H (2022) Eine einfache Methode zum Studium des normalen und pathologisch veränderten menschlichen zentralen Nervensystems (Conference Paper)

04/2022 Mitarbeit am Vortragsthema zur Frühjahrstagung – Region Nord 2022 (Potsdam):

Zander C, Trella S, Bohnert M (2022) Zum Phänomen der doppelstreifigen Hautblutungen

Zur vorliegenden Arbeit zugehörige Veröffentlichung:

[28] Bohnert S, Trella S, Preiß U, Heinsen H, Bohnert M, Zwirner J, Tremblay M, Monoranu CM, Ondruschka B (2022) Density of TMEM119-positive microglial cells in postmortem cerebrospinal fluid as a surrogate marker for assessing complex neuropathological processes in the CNS. *Int J Legal Med* 136: 1841-50. doi: 10.1007/s00414-022-02863-5