

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Direktor: Prof. Dr. Gerhard Adam

und

Institut für Rechtsmedizin (Dir.: Prof. Dr. Klaus Püschel)

und

Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (Dir.: Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim)

Diffusionsgewichtete Bildgebung und Spektroskopie mittels ex vivo Magnetresonanztomographie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tony Manfred Schmidt
aus Rostock

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 2.2.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gerhard Adam

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Klaus Püschel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	3
2.1 Rechtsmedizinische Aspekte	3
2.1.1 Heutiger Standard zur Todeszeitbestimmung	3
2.1.2 Heutiger Standard zur Todesursachenbestimmung	7
2.2 Radiologie in der forensischen Medizin	9
2.2.1 Computertomographie in der forensischen Medizin	9
2.2.2 Magnetresonanztomographie in der forensischen Medizin	10
3. Material und Methoden	12
3.1 Patientenkollektiv	12
3.1.1 Patientenkollektiv der diffusionsgewichteten Bildgebung (DWI)	12
3.1.2 Patientenkollektiv der Magnetresonanzspektroskopie (MRS)	12
3.2 Gerät und Sequenzen	13
3.3 Datenanalyse und Statistik	14
4. Publikationen	16
DWI of the brain: Postmortal DWI of the brain	
in comparison with in vivo data	17
Postmortem ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the skeletal muscle:	
α-ATP/Pi ratio as a forensic tool?	30
5. Diskussion	47
5.1 Diffusionsgewichtete Bildgebung des Gehirns	47
5.2 ³¹ P-Magnetresonanzspektroskopie der Oberschenkelmuskulatur	50
6. Zusammenfassung	55
7. Literaturverzeichnis	56
8. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	65
9. Danksagung	66
10. Lebenslauf	67
11. Eidesstattliche Versicherung	68

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Apparent Diffusion Coefficient
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
b-Wert	sequenzspezifische Größe, bestimmt die Stärke der Bewegungssensitivierung der Sequenz
CT	Computertomographie
DWI	Diffusion Weighted Imaging
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
FOV	field of view, Bildausschnitt
HASTE	half fourier-acquired single shot turbo spin echo
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	arithmetischer Mittelwert
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanztomographie)
PCr	Kreatinphosphat
Pi	anorganisches Phosphat
p.m.	post mortem
PME	Phosphomonoester
ROI	Region of Interest
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
T	Tesla

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Nach dem Auffinden einer Leiche ist die Frage nach dem Todeszeitpunkt in vielen Fällen von großer juristischer und versicherungsrechtlicher Bedeutung.

Heutiger rechtsmedizinischer Standard zur Todeszeitbestimmung ist die Rektaltemperatur-Todeszeit-Normogramm-Methode. Zusammen mit anderen Tests wird sie als Komplexmethode durchgeführt. Jedoch gibt es zahlreiche Faktoren, die die Genauigkeit der Methode beeinflussen oder deren Einsatz verbieten.

In den letzten 20 Jahren hat sich der Einsatz von Schnittbildgebung mittels Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) in der rechtsmedizinischen Praxis weit verbreitet. Dies sollte jedoch lediglich die Suche nach der Todesursache unterstützen. Nun ist es das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die funktionelle MR-Bildgebung, in Form von MR-Spektroskopie und diffusionsgewichteter Bildgebung, geeignet ist, die herkömmlichen Verfahren zur Todeszeitbestimmung zu ergänzen oder gar zu ersetzen.

Dabei wird die Diffusion im Gehirn, sowie die Konzentrationen von Phosphormetaboliten (unter anderem Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat) im Oberschenkelmuskel gemessen.

Bei pathologischen Prozessen im Gehirn kommt es auf Grund der Veränderung der Permeabilität von Zellmembranen zu charakteristischen Veränderungen der Diffusionsbewegung von Wassermolekülen. Diese können, beispielsweise beim Schlaganfall, im Magnetresonanztomographen (MRT) mit Hilfe der diffusionsgewichteten Bildgebung (diffusion weighted imaging = DWI) quantifiziert werden. Da es beim Tod des Menschen gleichfalls zur Permeabilitätsänderung an Membranen kommt, lassen sich auch hier, dem Schlaganfall ähnliche, Veränderungen darstellen. Die Diffusionsbewegung nimmt ab und der apparente Diffusionskoeffizient (ADC) wird geringer.

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Nukleotid, bestehend aus dem Triphosphat des Nucleosids Adenosin. ATP ist hauptsächlich die universelle Form unmittelbar verfügbarer Energie in jeder Zelle und gleichzeitig ein wichtiger Regulator energieliefernder Prozesse. ATP wird bei Bedarf aus anderen Energiespeichern (Kreatinphosphat = PCr) resynthetisiert. Als Energiequelle wird ATP für die grundlegenden energieverbrauchenden Prozesse aller Lebewesen genutzt:

Synthese von organischen Molekülen, aktiver Stofftransport durch Biomembranen hindurch sowie Bewegungen wie zum Beispiel bei der Muskelkontraktion.

Der Diffusionskoeffizient (ADC) und die Konzentrationen von PCr und ATP könnten ergänzende Parameter zur Bestimmung des Todeszeitpunkts sein. Dies würde der Fall sein, wenn sich ein charakteristischer postmortaler Verlauf dieser Parameter zeigt.

Diese Hypothese soll durch die Bestimmung des ADC und durch die Magnetresonanz-Spektroskopie geprüft werden.

Die Bestimmung des ADC erfolgt mittels diffusionsgewichteter Bildgebung (DWI). Die Konzentrationen an Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat werden mit Hilfe der ³¹P-Magnetresonanzspektroskopie (MRS) bestimmt.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen werden in dieser Form auch an Patienten durchgeführt. Somit können wir die ermittelten Werte mit denen aus der Literatur vergleichen.

So sollen im Rahmen dieser Untersuchungen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist es mit Hilfe der funktionellen MR-Bildgebung möglich die herkömmlichen Methoden zur Todeszeitbestimmung zuverlässig zu ergänzen?
2. Zeigen sich beim Vergleich mit in vivo Messwerten signifikante Unterschiede?

2. Einleitung

2.1 Rechtsmedizinische Aspekte

2.1.1 Heutiger Standard zur Todeszeitbestimmung

Die Rektaltemperatur-Todeszeit-Normogramm-Methode stellt die Leitmethode zur Todeszeitbestimmung dar,¹ jedoch kann mit ihr nur eine Eingrenzung der Todeszeit von 5 bis 6 Stunden erreicht werden. Zusammen mit den supravitalen Reaktionen und Leichenerscheinungen kann man als integriertes Verfahren versuchen, den Bereich weiter einzugrenzen.²

Vorwiegend durch Konvektion und Konduktion aber auch durch Strahlung und Verdunstung gleichen sich Körper- und Umgebungstemperatur nach dem Tod an. Die Körpertemperatur als Ausgangspunkt sinkt nicht sofort nach dem Tod, sie befindet sich 2 bis 3 Stunden postmortal auf einem Plateau. Die Ursache hierfür ist das radiäre Temperaturgefälle vom Kern zur Peripherie, das durch die langsamere Abkühlung des Körperinneren entsteht. Insgesamt ist der Verlauf der Abkühlungskurve sigmoidal. Die Geschwindigkeit des Abkühlungsvorgangs ist multifaktoriell bedingt. Zum einen hängt sie von der Beschaffenheit des Körpers ab (zum Beispiel Proportionen und Fett), zum anderen verändern Umgebungsfaktoren (Wind, Temperatur, Durchfeuchtung von Kleidung und Bedeckung) die Abkühlungsgeschwindigkeit. Im Durchschnitt fällt die Temperatur der Leiche um 0,5 °C bis 1,5 °C pro Stunde ab.²

Vorraussetzung für die Normogramm-Methode ist eine konstante Umgebungstemperatur zwischen Todeseintritt und Messung der Umgebungstemperatur. Diese muss kritisch betrachtet werden, da es sonst zu gravierenden Fehlern bei der Berechnung der Todeszeit kommen kann.¹

Die vorläufige Schätzung des Körpergewichts am Fundort kann unter Berücksichtigung der Körpergröße von erfahrenen Untersuchern auf ± 5 kg genau erfolgen, etwaige Fehler können durch Wiegen der Leiche vor der Obduktion korrigiert werden. Anschließend muss der Körpergewichtskorrekturfaktor abgeschätzt werden. Durch diesen werden Rahmenbedingungen berücksichtigt, die den Temperaturabfall der Leiche beeinflussen. Der Standard dafür ist eine unbekleidete Leiche bei ruhender Luft und eine thermisch indifferente Auflagefläche.¹

Des Weiteren muss vor der Anwendung der Rektaltemperatur-Todeszeit-Normogramm-Methode durch den Facharzt geprüft werden, ob dieses Verfahren überhaupt zulässig ist. Wenn der Fundort der Leiche und der Ort des Todeseintritts nicht übereinstimmen, ist dies nicht der Fall. Auch wenn sich Strahlungsquellen, zum Beispiel eine Fußbodenheizung, in der Umgebung der Leiche befinden, ist die Anwendung der Normogramm-Methode obsolet. Bei nicht näher eingrenzbarer Umgebungsmitteltemperatur muss auf andere Kriterien zur Todeszeitbestimmung zurückgegriffen werden.¹ Wenn die Rektaltemperatur zum Todeszeitpunkt von der Norm (37,2 °C) abweicht, kann auch dies in der Normogramm-Methode berücksichtigt werden. Zudem muss protokolliert werden, ob Veränderungen an der Leiche beziehungsweise dem Fundort durchgeführt worden sind. Die persönliche Erfahrung des Untersuchers spielt selbstverständlich eine Rolle bei der Genauigkeit der Ergebnisse und ist Voraussetzung für die gutachterliche Anwendung.¹

Wenn die Auffindesituation die Rektaltemperatur-Todeszeit-Normogramm-Methode nicht zulässt, sollten von der Leichentemperatur unabhängige Kriterien angewendet werden. Die Auswahl der Kriterien hängt von der Praktikabilität am jeweiligen Fundort ab und soll ein möglichst schnelles Ergebnis liefern.

Ein in der Rechtsmedizin seit langer Zeit angewandtes Verfahren zur Bestimmung der Todeszeit ist die Untersuchung der Leichenerscheinungen sowie deren Ausprägung. Dazu gehören die sicheren Todeszeichen (Leichenflecke und Leichenstarre) und die supravitalen Reaktionen.

„Supravitale Reaktionen sind über den Individualtod hinaus auslösbare „Lebensäußerungen“ von Geweben auf Reize.“² Voraussetzung für ihr Auftreten sind nach dem Tod ablaufende Stoffwechselprozesse, vor allem die anaerobe Glykolyse. Die supravitale Phase überschreitet die Wiederbelebungszeit des jeweiligen Gewebes, das heißt die maximale Zeit, die das Organ ohne Sauerstoffzufuhr überlebt, ohne funktionelle Defizite zu entwickeln. Die darüber hinausgehende supravitale Phase ist die Zeit bis zum vollständigen Ausbleiben von Reaktionen. Die Dauer der supravitalen Phase ist gewebs- und ortsspezifisch und wird durch den lokalen Temperaturabfall beeinflusst, der abhängig vom Durchmesser des jeweiligen Körperteils ist.²

Ein Verfahren zum Auslösen supravitaler Reaktionen ist die mechanische Erregung der Skelettmuskulatur, mit der man die Auslösbarkeit des Zsako-Sehnen- oder Muskelphänomens beziehungsweise eines idiomuskulären Wulstes prüft. Hierbei

kann zum Beispiel der Musculus biceps brachii mit einem Messerrücken angeschlagen werden, wobei sich der Muskel kontrahiert. In der frühen postmortalen Phase, innerhalb von 1,5 h bis 2,5 h p.m., wird diese Kontraktion über den gesamten Muskel fortgeleitet. Zu einem späteren Zeitpunkt, 4 - 5 h p.m., entsteht hierbei keine Kontraktion, sondern ein kräftiger, reversibler idiomuskulärer Wulst. Dieser bildet sich aufgrund des noch hohen ATP-Gehalts der Muskulatur zurück (Weichmacherwirkung). 8 bis 13 Stunden nach dem Tod entsteht bei gleichem Vorgehen lediglich ein schwacher idiomuskulärer Wulst, der jedoch bis zu 24 Stunden persistieren kann.²

Ein weiteres Verfahren ist die elektrische Stimulation der mimischen Gesichtsmuskulatur. Dieses stellt die Methode der Wahl zur Bestimmung der Todeszeit mit Hilfe der supravitalen Reaktionen dar. Hierfür ist es allerdings unbedingt notwendig, dass die Regeln zur Durchführung genau eingehalten werden. Dies betrifft sowohl die Positionierung der Elektrode als auch die Verwendung von normierten Reizgeneratoren. Von diesen werden definierte Reize mit einer Stromstärke von 30 mA, einer Frequenz von 50/s und einer jeweiligen Dauer von 10ms abgegeben. Dabei wird eine Elektrode in das mediale Oberlid eingestochen. Von der Reizausbreitung, nicht jedoch von der Kontraktionsstärke, im Gesicht des Verstorbenen kann in 6 Stufen auf die Todeszeit geschlossen werden.²

Auch die glatte Irismuskulatur des Auges kann durch pharmakologische Reizung bis zu 50 Stunden post mortem, und somit deutlich länger als die Skelettmuskulatur, erregt werden. Dazu werden pupillomotorische Pharmaka unter die Konjunktiva injiziert. Die Injektion muss streng oberflächlich erfolgen, damit eine Injektion in die vordere Augenkammer vermieden wird, wodurch paradoxe und falsch-positive Reaktionen entstehen. Die Wirkung setzt nach 5 bis 30 Minuten ein und dauert circa 1 Stunde. Körpereigene Transmitter (Adrenalin, Noradrenalin und Acetylcholin) erzielen dabei die deutlichste Wirkung. Dem liegt das Cannon-Rosenblueth'sche Denervations-Gesetz zu Grunde. Dies besagt, dass denervierte Strukturen ihrem humoralen Mediator gegenüber überempfindlich sind.²

Leichenflecken (Livores) gehören zu den sicheren Todeszeichen und treten am frühesten postmortal auf. Sie sind durch ihre Farbe, Lokalisation am Körper, die Intensität ihres Auftretens sowie deren Wegdrückbarkeit und Verlagerbarkeit charakterisiert. Zur Todeszeitbestimmung werden vor allem letztere Eigenschaften herangezogen. Durch den Kreislaufstillstand, der mit dem Eintreten des

Individualtodes einsetzt, wird der hydrostatische Druck die treibende Kraft für die Bewegung von Flüssigkeiten im Körper. Auf Grund der Hypostase sinken die Flüssigkeiten aller Kompartimente des menschlichen Körpers hinab. So auch das Blut, das sich in den abhängigen Körperpartien sammelt. Die Aufliegeflächen bleiben ausgespart, da sich auf Grund des dort herrschenden Aufliegedrucks kein Blut in diesen Partien ansammelt. Diese Senkungsblutfülle in den Kapillaren erscheint äußerlich zunächst als kleine hellrote Flecken, die später zu großen Arealen konfluieren. Auch die Farbe der Livores verändert sich. Anfangs erscheinen sie hellrot, später sind sie dunkelrot bis violett. Neben den schon besprochenen Kriterien wie Lokalisation und Farbe gibt es noch zwei weitere Eigenschaften von Leichenflecken, die für die Todeszeitbestimmung von besonderer Bedeutung sind. Zum einen ist dies die Wegdrückbarkeit von Leichenflecken durch Daumendruck. Frühpostmortal sind diese schon mit relativ geringem Kraftaufwand vollständig wegdrückbar. Nach längerer postmortalen Phase wird hierzu ein größerer Druck beziehungsweise mehr Zeit notwendig oder die Leichenflecke sind nur noch unvollständig wegdrückbar. Später ist es gar nicht mehr möglich, die Flecken wegzudrücken. Zum anderen ist die Verlagerbarkeit der Leichenflecke durch Wenden des Körpers ein wertvolles Kriterium zur Todeszeitbestimmung. Kurz nach dem Tod können sich die Leichenflecke an anderer Stelle neu ausbilden, wenn die Lage der Leiche verändert wird. Das Blut sammelt sich in den neuen abhängigen Körperregionen. Mit zunehmender Todesdauer blassen die Livores in Folge eines solchen Manövers nur noch ab beziehungsweise sind in ihrer Lokalisation vollständig fixiert.²

Die Leichenstarre (Rigor mortis) ist eine wichtige frühe postmortale Veränderung, die häufig genutzt wird, um den Todeszeitpunkt einzuschätzen³. Einige Forscher haben gezeigt, dass ihre Entstehung von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, so zum Beispiel von der Umgebungstemperatur, dem pH-Wert der Muskulatur, der Todesursache, Aktivitäten beziehungsweise Bewegungen, die vor dem Tod ausgeführt wurden und der Konstitution des Verstorbenen.^{4, 5} Im Allgemeinen tritt die Leichenstarre etwa 3 bis 4 Stunden post mortem ein. Mit Eintreten des Kreislaufstillstands erschlafft die Muskulatur zunächst vollständig. In den ersten Stunden nach dem Tod kann durch biochemische Prozesse (Kreatinkinase-reaktion und anaerobe Glykolyse) ATP in Abhängigkeit von dem Glykogenvorrat des Körpers resynthetisiert werden. Wenn die Konzentration an ATP jedoch unter 85% des

Wertes beim Lebenden fällt, bleiben Aktin- und Myosinfilamente miteinander verbunden. Das Vorhandensein der Totenstarre wird durch die passive Bewegung eines Gelenks geprüft. In ihrer maximalen Ausprägung ist selbst bei maximaler Anstrengung des Untersuchers keine Bewegung in dem betroffenen Gelenk möglich. 1811 formulierte Nysten eine später nach ihm benannte Regel zur Reihenfolge der Ausprägung der Leichenstarre im menschlichen Körper: Zuerst entsteht diese im Kiefergelenk und im Nacken, später in den oberen und dann unteren Extremitäten. Muskelgruppen, die vor dem Todeseintritt an ATP verarmen (z.B. Beinmuskulatur beim Joggen), können eine frühere Ausprägung der Starre zeigen. Nicht in allen Fasern eines Muskels prägt sich die Leichenstarre gleichzeitig aus, sodass es möglich ist, die Starre zu brechen. Da in anderen Fasern des Muskels erst danach die Starre eintritt, ist eine erneute Leichenstarre zu beobachten. Dieses Phänomen kann 6 bis 8 Stunden post mortem auftreten. Der Ausprägungsgrad der Leichenstarre nach dem Brechen ist abhängig vom Zeitpunkt. Wenn die Starre früh durchbrochen wird, prägt sie sich danach stärker aus. Durch Proteolyse löst sich die Rigor mortis in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur nach etwa 2 bis 3 Tagen.⁶

2.1.2 Heutiger Standard zur Todesursachenbestimmung

Zur Bestimmung von Todesart und Todesursache dient die ärztliche Leichenschau und in besonderen Fällen die Obduktion. Diese sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Grundsätzlich ist die erste Aufgabe der Leichenschau die Feststellung des Todes. Darüber hinaus dient sie auch der Klärung rechtlicher Aspekte, der Bekämpfung von Seuchen und der Erhebung von Statistiken.⁷ Landesgesetze regeln, dass jede Leiche von einem Arzt untersucht und im Anschluss hieran die Todesbescheinigung ausgefüllt werden muss. Die Leichenschau muss an der vollständig entkleideten Leiche durchgeführt werden.⁸ Darauf kann nur verzichtet werden, wenn die Auffindesituation dies nicht zulässt (zum Beispiel in der Öffentlichkeit) oder offensichtlich ein Kriminaldelikt vorliegt.

Die Todesfeststellung muss anhand der sicheren Todeszeichen (Leichenflecke, Totenstarre, Fäulnis) erfolgen. Besondere Schwierigkeiten ergeben sich in der Phase unmittelbar nach dem leblosen Zusammenbrechen des Betroffenen, da erst nach

einem Intervall von circa 30 Minuten Leichenflecke als erstes sicheres Todeszeichen auftreten. Auf Grundlage unsicherer Todeszeichen (lichtstarre, weite Pupillen, fehlende Atmung, Absinken der Körperkerntemperatur) darf der Tod nicht festgestellt werden.⁹

Darüber hinaus muss der Leichenschauer im zweiten Schritt über die Todesart entscheiden. Hier gibt es die Möglichkeit des natürlichen und nicht-natürlichen Todes. Die Entscheidung kann als Konsequenz eine Obduktion nach sich ziehen. Eine natürliche Todesart liegt vor, wenn der Tod aus innerer Krankheit erfolgt.¹⁰ In den meisten Bundesländern gibt es zusätzlich die Möglichkeit der ungeklärten Todesart, bei der weder klar ist, ob der Tod aus innerer Krankheit erfolgt, noch Anzeichen für äußeres Einwirken bestehen. Bei ungeklärter Todesart und nicht-natürlichem Tod muss die Polizei benachrichtigt werden, welche diesen Todesfall der Staatsanwaltschaft anzeigt.

Im Unterschied zur Todesart handelt es sich bei der Todesursache um eine medizinische und keine juristische Entscheidung.¹⁰ Die Leichenschau ist in den seltensten Fällen geeignet, die Todesursache korrekt festzustellen. Dies ist nur mit der lückenlosen Kenntnis der Krankengeschichte oder durch Durchführung einer Obduktion möglich.¹⁰ Beides ist in der Praxis jedoch selten der Fall. Es ist bekannt, dass die auf der Todesbescheinigung vermerkte Todesursache oft nur gemutmaßt ist.¹¹ Um genaue Aussagen zur Todesursache machen zu können, ist eine Obduktion nötig. Diese kann zum einen gerichtlich angeordnet werden, wenn ein Verbrechen vermutet wird oder eine ungeklärte Todesursache vorliegt. Zum anderen kann diese auf Wunsch der Angehörigen beziehungsweise aus versicherungsrechtlichen Gründen durchgeführt werden. Je nach Fragestellung kann der durchführende Arzt Rechtsmediziner oder Pathologe sein.

Die Obduktion gliedert sich in eine innere und eine äußere Besichtigung.¹² Das Vorgehen sollte möglichst standardisiert erfolgen, um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zu erreichen sowie Vollständigkeit zu garantieren.

Die äußere Besichtigung beinhaltet die Inspektion der Kleidung. Darüber hinaus werden Größe, Gewicht, Ernährungszustand und Hautkolorit begutachtet. Lokalisation und Ausprägung der sicheren Todeszeichen müssen exploriert werden, ebenso wie Hautveränderungen, Wunden und Narben. Insbesondere bei der rechtsmedizinischen Obduktion kommt diesem Teil erhebliche Bedeutung zu.¹³ Bei

der inneren Besichtigung werden die drei Körperhöhlen (Schädel, Brust- und Bauchraum) geöffnet. Brust und Bauch werden mittels Y- oder T-Schnitts geöffnet. Diese ermöglichen nach Entfernung von Sternum und Rippen das Erreichen aller innen liegenden Organe, die dann entnommen und nach ihrer Beschaffenheit (unter anderem Größe, Farbe, Konsistenz) untersucht werden. Aufgrund charakteristischer Organveränderungen kann dabei auf die Todesursache geschlossen werden. Um diese morphologischen Befunde zu unterstützen, können Proben von Organen entnommen werden, welche histologisch und mikrobiologisch untersucht werden. Auch toxikologische Untersuchungen können veranlasst werden, wozu Urin und Blut gewonnen werden.¹⁴

Aufgrund des zunehmenden Kostendrucks im Gesundheitswesen ist die Autopsierate ($\text{Autopsierate (\%)} = \frac{\text{Anzahl autopsierter Verstorbener}}{\text{Anzahl Verstorbener}} \times 100$) in der BRD von 10% (1980) auf 3,1% (1999) gesunken.¹⁵

In einigen Zentren wird die Obduktion durch neuere Verfahren, zum Beispiel Computertomographie und Magnetresonanztomographie ergänzt. Die Relevanz dieser wird im Folgenden weiter erörtert.

2.2 Radiologie in der forensischen Medizin

Bereits ein Jahr nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen im Jahre 1895 wurden mit diesen Untersuchungen an Verstorbenen durchgeführt.¹⁶ Auch die Ultraschall-Technologie, die einige Jahrzehnte später entwickelt wurde, wurde für Post-mortem-Untersuchungen genutzt.¹⁷ Da weltweit die Zahl der durchgeführten Obduktionen rückläufig ist, können bildgebende Verfahren ein wirksames Mittel sein um dennoch wichtige Informationen über die Todesursache zu gewinnen.¹⁷

2.2.1 Computertomographie in der forensischen Medizin

In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde erstmals die Computertomographie zur Untersuchung von Leichen genutzt. Die erste Arbeit dazu wurde 1982 veröffentlicht.¹⁸ Diese zeigte, dass die postmortale CT die Autopsie in der Rechtsmedizin teilweise ersetzen könnte, so zum Beispiel bei Schussverletzungen.¹⁹ Schumacher et al. kamen zu dem Schluss, dass die CT eine wertvolle Ergänzung zu neuropathologischen Untersuchungen in der forensischen Medizin ist. Ihre Arbeit

brachte hervor, dass die CT zwischen Eintritts- und Austrittswunden differenzieren und der Verlauf des Schusskanals dargestellt werden kann.²⁰

2.2.2 Magnetresonanztomographie in der forensischen Medizin

Obwohl die CT die Methode der Wahl zur Darstellung knöcherner Verletzungen und pathologischer Gasansammlungen ist, gewinnt die Magnetresonanztomographie in der postmortalen Bildgebung an Bedeutung, weil sie der CT bei der Darstellung von Weichteilverletzungen deutlich überlegen ist.^{21, 22}

Die Anwendung der Kernspintomographie in der forensischen Medizin begann mit der Identifikation eines Verstorbenen.²³ Die erste vergleichende Studie wurde 1990 veröffentlicht. In dieser wurden die mittels MRT erhobenen Untersuchungsergebnisse mit denen der Autopsie verglichen.²⁴ Ende der 90er Jahre gelang es einigen Forschungsgruppen, die organisatorischen und logistischen Hürden für die MR-Bildgebung von Verstorbenen zu überwinden. Bis dahin war es nur möglich, die Untersuchungen außerhalb der Untersuchungszeiten für die Patienten durchzuführen.²⁵

Im Hinblick auf die Klärung der Todesursache sind MR-Untersuchungen gut geeignet, um beispielsweise Gehirntraumata zu analysieren. Insbesondere bei der Lokalisation von Gehirnödemen und intracraniellen Blutungen, die während der Obduktion versickern, ist die MRT hilfreich.²⁶

Große Bedeutung kommt der MRT bei der Untersuchung des kardiovaskulären Systems zu. Die CT ermöglicht es lediglich, Kalzifizierung der Koronargefäße darzustellen, jedoch können mit Hilfe der MRT auch strukturelle Veränderungen des Myokards, wie Kollagen-Infarktnarben, als Residuen kardialer Ischämie diagnostiziert werden.

Wichtige forensische Reaktionen wie Luft- oder Gasembolien können mit Hilfe der MRT im Gegensatz zu Fettembolien ohne Schwierigkeiten diagnostiziert werden. Ebenso lassen sich mit der postmortalen Bildgebung Pneumothoraces, Lungenkontusionen sowie Blutaspersionsverletzungen darstellen.²⁶

Eine optimale postmortale Bildgebung besteht in der Diagnose von Skelettverletzungen durch CT und anschließender Identifizierung von korrespondierenden Weichteilverletzungen im Fett- beziehungsweise Muskelgewebe.²⁷ Diese sind für die Rekonstruktion von Tathergängen in der

forensischen Medizin von großer Bedeutung. Für diesen Bereich ist die MRT aufgrund des höheren Weichgewebskontrastes die Methode der Wahl.²⁷ Yen et al. untersuchten einige Fälle von Strangulation, indem post mortem MR-Befunde und Obduktionsergebnisse miteinander verglichen wurden.²⁸ Diese Erkenntnisse konnten auf die Begutachtung von Gewaltopfern, die eine Strangulation überlebt haben, angewandt werden. Somit konnte objektiver als zuvor beurteilt werden, mit welcher Gewalt auf den Hals eingewirkt worden war. Bisherige Verfahren hierzu, Anamnese und Inspektion äußerer Hautveränderungen, sind ungenau und subjektiv. Somit stellt die MRT eine wertvolle ergänzende Untersuchung dar.

Diese Beispiele machen deutlich, dass moderne bildgebende Verfahren Einzug in die klinische und klassische forensische Medizin gefunden haben. Momentan werden diese Methoden als Ergänzung zur Obduktion oder als systematische postmortale Untersuchung erprobt und bewertet.²⁶ Die CT hat dank ihrer verhältnismäßig leichten Handhabung das konventionelle Röntgen in rechtsmedizinischen Instituten bereits abgelöst. Da die MRT in ihrer Durchführung jedoch komplexer und kostspieliger ist, wird es vermutlich noch einige Zeit dauern, bis sich dieses Verfahren in der Routineuntersuchung von Leichen durchgesetzt hat. Jedoch hat die postmortale Bildgebung, insbesondere die MRT, großes Potential und bietet viele Vorteile. Beispielsweise können Untersuchungen bei Verstorbenen durchgeführt werden, deren Angehörige eine Obduktion aus religiösen Gründen ablehnen. Die postmortale Bildgebung ist nichtinvasiv, weshalb das Infektionsrisiko für die Untersucher sinkt. Des Weiteren können die Untersuchungsdaten auf Datenträgern gespeichert und anderen Spezialisten vorgelegt werden, um eine Zweitmeinung einzuholen und Ergebnisse zu diskutieren. Auch konnten durch die Untersuchung von Leichen mittels MRT mittlerweile Kenntnisse erworben werden, die bei der Beurteilung der Verletzungen von Gewaltopfern genutzt werden.²⁶

Voraussetzung für eine funktionierende postmortale Bildgebung ist einerseits eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit, um radiologische Befunde fachfremden Mitarbeitern erläutern zu können. Andererseits sind immense Investitionen und bauliche Veränderungen, beispielsweise in rechtsmedizinischen Instituten, erforderlich, um eine optimale Infrastruktur zu schaffen, die es erlaubt, die postmortale MRT bestmöglich durchzuführen.

3. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an Wochenenden, außerhalb der Routinediagnostik, durchgeführt. Die Verstorbenen wurden nicht nach Geschlecht getrennt und bis zum Ende der Untersuchung bei Raumtemperatur gelagert. Die Messungen wurden in Intervallen von einer Stunde über einen Zeitraum bis 24 Stunden nach dem Tod durchgeführt.

Die Körpertemperatur wurde mithilfe eines digitalen Thermometers rektal, außerhalb des Untersuchungsraums, gemessen. Deshalb mussten die untersuchten Regionen aufgrund der Umlagerung bei jeder Untersuchung neu lokalisiert werden. Das Studienprotokoll wurde von der Promotionskommission genehmigt.

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Patientenkollektiv der diffusionsgewichteten Bildgebung (DWI)

In der vorliegenden Studie wurden 21 Verstorbene (13 männlich, 8 weiblich) untersucht, die eines natürlichen Todes verstorben waren und durch das Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf bereitgestellt worden sind. Das mittlere Alter der Untersuchten lag bei $70,5 \pm 8,7$ Jahren (Spanne: 51 – 85 Jahre) und das mittlere Körpergewicht bei 74 ± 18 kg, siehe Tabelle 3.1. Die mittlere Rektaltemperatur der Leichen sank während des Untersuchungszeitraums von $31,6 \pm 3,3$ °C auf $27,9 \pm 2,2$ °C ab. Um die Vergleichbarkeit der erhobenen Werte zu überprüfen, wurde ebenfalls eine Kontrollgruppe von 3 männlichen Normalpersonen untersucht (mittleres Alter: $38,7 \pm 24,5$ Jahre, Spanne: 24 – 67 Jahre, mittleres Körpergewicht: 81 ± 17 kg). Ausschlusskriterien waren implantierte Herzschrittmacher, eine nicht-natürliche Todesursache und Kühlung.

3.1.2 Patientenkollektiv der Magnetresonanzspektroskopie (MRS)

Es wurden acht Verstorbene (5 männlich, 3 weiblich, mittleres Alter: 73 ± 7 Jahre, mittleres Gewicht: $65,8 \pm 15,9$ kg) untersucht. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu prüfen wurde hier eine Kontrollgruppe aus zwei männlichen und einer

weiblichen Person untersucht (mittleres Alter: 51 ± 24 Jahre, Spanne: 24 – 69 Jahre, mittleres Körpergewicht: $84,0 \pm 16,5$ kg).

3.2 Gerät und Sequenzen

Die Untersuchungen wurden in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des UKE an einem 1,5 Tesla (T) Magnetresonanztomographen (Magnetom Symphony®, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Für die Bildgebung des Gehirns wurde die 8-Kanal-Kopfspule benutzt. Zur anatomischen Orientierung wurden ein Localizer sowie fluid attenuated inversion recovery (FLAIR)- und half fourier-acquired single shot turbo spin echo (HASTE)-Sequenzen eingesetzt. Basierend auf den FLAIR-Bildern wurde eine diffusionsgewichtete echo-planare spin-echo-Sequenz mit b-Werten von 0 und 1000 s/mm^2 in transversaler Orientierung gefahren (siehe Tabelle 3.1), um den ADC von Thalamus, Cerebrum und Cerebellum zu messen. Die Messzeiten betrugen circa 4 bis 6 Minuten für die DWI des Gehirns und 30 Minuten für die gesamte Messung und die Patientenpositionierung.

Tabelle 1: MRT-Parameter der benutzten DWI-Sequenz im Gehirn bei 1,5 T (Magnetom Symphony®, Siemens, Erlangen, Germany).

Sequenz	ep2d_diff_trace_ADC
TR [ms]	3000
TE [ms]	87
Flipwinkel	90°
Field of view [mm]	230 x 230
Matrix	192 x 256
Pixelgröße [mm]	0,90 x 0,90
Schichtdicke [mm]	5
Schichtabstand [mm]	1,5
Mittelungen	2
b-Werte	0 / 1000

Bei der ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie wurde die Standard- $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ -Doppelresonanz-Oberflächenspule ($27 \times 27 \text{ cm}^2$ Sendespule, Empfängerspule: Durchmesser 12 cm) unter der untersuchten Oberschenkelmuskulatur platziert. So konnten ^{31}P -Spektren bei einer Frequenz von 25,7 MHz aus einem

Detektionsvolumen von 6 cm Gewebetiefe gemessen werden. Zur Lokalisation des Musculus adductor magnus wurden transversale sowie sagittale und coronare ^1H -Localizer benutzt. Eine free induction decay-Sequenz (muscle_fid_noe), welche den Kern-Overhauser-Effekt nutzt, mit TR = 700 ms, TE = 0.35 ms, einem Flipwinkel von 90° und 256 Mittelungen wurde für die ^{31}P -Spektroskopie genutzt, siehe Tabelle 3.2.

Tabelle 2: MRT-Parameter der benutzten MRS-Sequenz im Musculus adductor magnus bei 1,5 T (Magnetom Symphony®, Siemens, Erlangen, Germany).

Sequenz	muscle_fid_noe
TR [ms]	700
TE [ms]	0,35
Flipwinkel	90°
Mittelungen	256
Wasserunterdrückung [Hz]	35
Vektorgroße	1024

3.3 Datenanalyse und Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Siemens Software (Syngo MR A30A, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Zu definierten Zeitpunkten wurden der mittlere ADC im Gehirn sowie die Konzentrationen von Phosphormetaboliten im Musculus adductor magnus ermittelt.

Regions of interest (ROI) mit einer Größe von $1,0 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ (temporale weiße Substanz des Cerebrum, Lobulus simplex des Cerebellum und Thalamus) wurden manuell in die ADC-Maps gezeichnet.

Die gemessenen Daten im Zeitraum wurden mittels Spektral-Analyse (ACD/NMR Processor Academic Edition: Version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, Canada) ausgewertet.

Nach der Basislinien-Korrektur wurde die Fläche unter jedem identifizierbaren Peak als Parameter für die Metabolitkonzentration bestimmt. Dabei wurde ein gemischtes Gauss-Lorentz-Modell zur Peak-Anpassung benutzt. Da kein externer ^{31}P -Standard genutzt wurde, konnten nur relative Metabolitkonzentrationen gebildet werden, indem die Signalintensitäten der verschiedenen Peaks zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden.

In dieser Arbeit wurde die parametrische Statistik (arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Standardfehler und Student's T-Test) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verwendet. Darüber hinaus wurde der Pearson Korrelationskoeffizient r genutzt. Die ATP/Pi-Ratios als Funktion der Zeit post mortem wurde mit einem exponentiellen Modell analysiert, wobei der Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Kurvenanpassung gewählt wurde. Außerdem wurden die post mortem Daten mit der Kontrollgruppe ($n = 3$) und den Literaturwerten mittels Diskriminanz-Analyse verglichen.²⁹

4. Publikationen

Schmidt TM, Fischer R, Acar S, Lorenzen M, Heinemann A, Wedegaertner U, Adam G, Yamamura J. DWI of the brain: Postmortal DWI of the brain in comparison with in vivo data. *Forensic Sci Int* 2012; 220:180–183.

Schmidt TM, Wang ZJ, Keller S, Heinemann A, Acar S, Graessner J, Schoennagel BP, Adam G, Fischer R, Yamamura J. Postmortem ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the skeletal muscle: α -ATP/Pi ratio as a forensic tool?. *Forensic Sci Int* 2014; 242:172–176.

DWI of the brain: Postmortal DWI of the brain in comparison with in vivo data

Tony M Schmidt¹, Roland Fischer^{2,3}, Suzan Acar¹, Martin Lorenzen¹, Axel Heinemann⁴,
Ulrike Wedegärtner¹, Gerhard Adam¹, Jin Yamamura¹

University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

Martinistraße 52

20246 Hamburg, Germany

Corresponding author: Tony Schmidt

Telephone Number: ++49 40 74105 8880

Fax Number: ++49 40 74105 3802

Email: tonymanfred.schmidt@googlemail.com

¹Department of Diagnostic and Interventional Radiology. University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

²Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

³Children's Hospital & Research Center Oakland, 747 52nd Street
Oakland, CA 94609, USA

⁴Department of Legal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

Abstract

Purpose

Changes in water diffusion can be quantified by diffusion-weighted MR imaging. However, there are only few reports about changes in post mortem brain. The aim of this study was to investigate the temporal pattern of the apparent diffusion coefficient (ADC) in the brain after death, to compare the values to in vivo brain and to assess the value of ex vivo DWI as a forensic tool.

Material and Methods

The study was approved by the local Ethics Committee, and informed consent was obtained from all relatives and the control subjects. Twenty-one corpses, died of natural cause, were examined (13 male, 8 female; age: 70.5 ± 8.7 y, weight 74 ± 18 kg). Diffusion-Weighted Imaging (DWI) was performed with b-values of 0 and 1000 s/mm² at 1.5 T. Scans were repeated in intervals of one hour. ADC-maps were calculated in thalamus, cerebrum and cerebellum. The obtained values were statistically compared to healthy volunteers (n=3) and to literature data.

Results

The ADC in the three regions decreased characteristically during the examination time. In the cerebrum there was a significant difference between ex vivo and in vivo ADC ($p < 0.001$) as well as in the other regions (thalamus: $p < 0.001$, cerebellum: $p = 0.045$).

Conclusion

DWI of the postmortal brain can be added to the MRI methods for a post mortem imaging.

Keywords

Post mortem

Brain

Magnetic resonance imaging

Diffusion-weighted imaging

Introduction

In recent years, diagnostic radiology has been playing an important role in the forensic medicine. Magnetic resonance imaging (MRI) was introduced in the forensic medicine as a second line tool, especially for identifying soft tissue injuries. Radiological imaging could play a significant role in forensic medicine by adding important information [1]. MRI is especially suited for analyzing head and brain injuries, detecting edema within the brain parenchyma or identifying contusions of the lung and blood aspiration [2]. As a future concept of post mortem imaging, CT (computed tomography) and MRI investigations should be combined for skeletal injuries and soft tissue damages, respectively [3].

Another MRI technique is the diffusion-weighted imaging (DWI), which evaluates the molecular diffusion from the Brownian motion of the spins in biological tissues. DWI provides information on both the perfusion and the diffusion in any organ to characterize abnormal tissue changes within the sites. This technique is an established method in diagnosing acute strokes. In recent studies, also other organs than the brain, e.g. parotid glands or lung, were measured by determining the apparent diffusion coefficient (ADC) using this technique [4-6]. After an ischemic stroke, characteristic changes of water diffusion due to cell depolarization and cytotoxic edema can be assessed by DWI in the diagnosis of stroke and the selection of therapy [7].

So far, there are few DWI investigations of fetal corpses [8,9]. But the DWI of post mortem brain could be a useful tool in forensic medicine to determine the time of death, if there are characteristic and reproducible post mortem ADC changes. In this study, we wanted to evaluate these post mortem ADC changes, to compare them to normal brain as well as stroke and to assess the role of ex vivo DWI as a forensic tool.

Materials and Methods

Patients

Twenty-one corpses, died of natural cause (myocardial infarction, pneumonia, sepsis, malignant tumours), were examined over a period of 2 to 23 h post mortem (13 male, 8 female; mean age: 70.5 ± 8.7 y, range: 51 – 85 y, mean body weight: 74 ± 18 kg). Corpses which died of diseases related to the central nervous system were excluded. The corpses were not matched concerning the gender and they were stored at room

temperature until the scanning. The core temperature was rectally measured throughout the MRI examination. MRI scans were started not later than 6 h post mortem and performed with scan intervals of one hour. The scans were performed at the weekend out of the examination times for routine diagnostics. The core temperature was measured using a digital rectal thermometer outside the scanning room. That is why for each acquisition the examined area had to be localized again due to repositioning. To check the comparability of the ADC values a control group of 3 male subjects (mean age: 38.7 ± 24.5 y, range: 24 – 67 y, mean body weight: 81 ± 17 kg) was examined at a single time point as well. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (11/11/2010), and informed consent was obtained from all relatives and the control subjects.

MRI Imaging Protocol

All examinations were performed on a 1.5 T MRI (Magnetom Symphony; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with an 8-channel-head-coil for brain imaging. For the morphological orientation a localizer as well as a fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) - sequence (repetition time (TR) 7900 ms, echo time (TE) 105 ms, inversion time (TI) 2500 ms, field of view (FoV) 172 x 230, matrix 256 x 156, slice thickness 5 mm, gap 1.5 mm, voxel size $0.4 \times 0.4 \times 5$ mm³) and a half fourier-acquired single shot turbo spin echo (HASTE) - sequence (TR 3000 ms, TE 87 ms, FoV 230 x 230 mm, matrix 128 x 96 mm slice thickness 5 mm, gap 1.5 mm, voxel size $0.9 \times 0.9 \times 5$ mm³) in transverse, coronal and sagittal orientation were performed.

Diffusion-Weighted Imaging

Based on the FLAIR images a diffusion-weighted spin echo echo-planar sequence was generated in transversal orientation to include the thalamus, cerebrum and cerebellum: TR 3000 ms; TE 87 ms; FOV 230 x 230 mm; matrix 192 x 256 mm; slice thickness 5 mm; gap 1.5 mm; voxel size $0.9 \times 0.9 \times 5$ mm³; 20 slices. As a total 2 averages were acquired and scan time was about 4 to 6 minutes summing up to 30 minutes including time for corps positioning and localization of the brain structures.

The ADC is given by the following equation:

$$S(b_1) = S(b_0) \exp(-b_1 \cdot \text{ADC}),$$

where $S(b_1)$ is the signal intensity of the image measured with a gradient pulse $b_1 = 1000 \text{ s/mm}^2$, while $S(b_0)$ estimates the signal intensity for a b-value of 0 s/mm^2 . The diffusion-weighting was performed with a trace weighted sequence type (3 orthogonal directions). According to this equation, pixelwise ADC-maps were generated as grey values using the Siemens based software (Syngo MR A30A, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany).

Image and Statistical Analyses

A region of interest (ROI) of $1.0 \pm 0.03 \text{ cm}^2$ size was manually drawn on the ADC-maps in temporal white matter, Thalamus and lobulus simplex of the cerebellum (all right hemisphere), see Fig. 1. Parametric statistics (arithmetic mean value $\pm$ standard deviation (SD), standard error of the mean (SEM), and Student's T-test) was used throughout this work with a significance value of $p < 0.05$ for group differences. In comparisons with our few control subjects ($n = 3$), the more robust discriminatory power test was used [10].

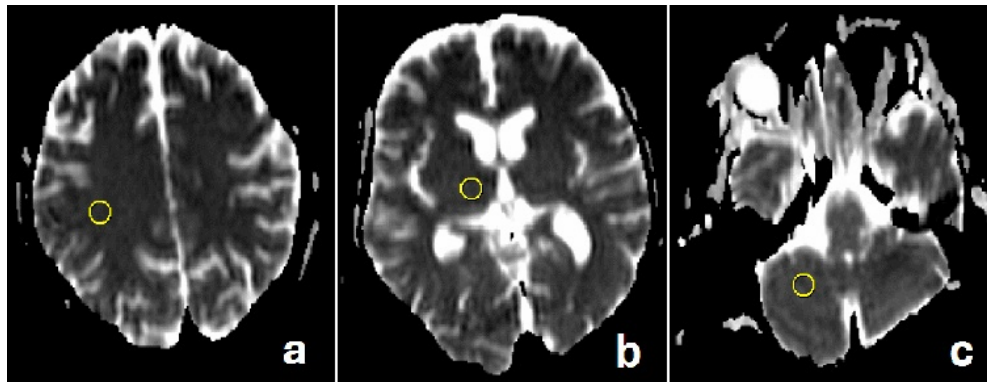


Fig. 1. Placement of the ROIs (1 cm^2) in the transverse ADC maps (b-values of 0 and 1000 s/mm^2 at 1.5 T): (a) Cerebrum (temporal white matter), (b) Thalamus and (c) Cerebellum (lobulus simplex).

Results

Postmortal course of ADC

The DWI of the thalamus showed an initial decrease of the ADC from $44.5 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ (2 h p.m.) to $30.3 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ (4 h p.m.), see Fig. 2. Five hours post death there was an increase in ADC which reached a value of $38.3 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$. During the following hours the ADC decreased and reached a minimum at 19 h p.m. ($20.0 \cdot 10^{-5}$

mm²/s). At the end of our examination, there was another increase of the ADC ($35.0 \cdot 10^{-5}$ mm²/s).

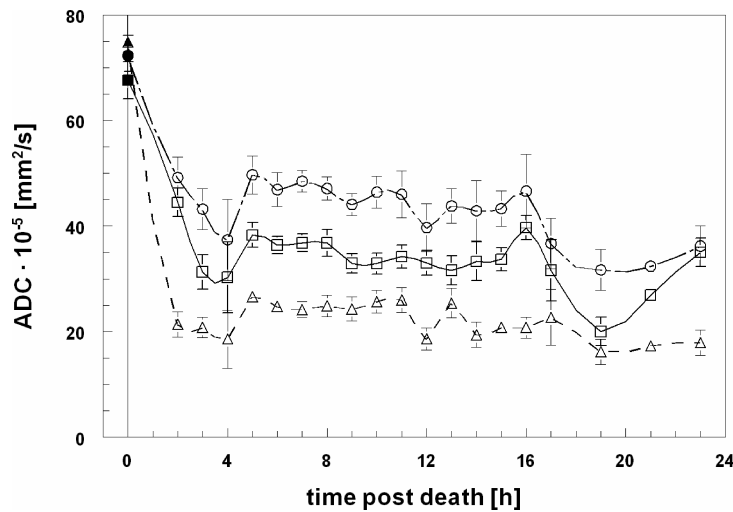


Fig. 2. Time course of the ADC (mean $\pm$ SEM values) in post mortem cerebellum (circles), thalamus (squares), and cerebrum (triangles) with cubic spline functions as guidelines for the eye (dotted-dashed, solid and dashed lines, respectively) together with in vivo data from 3 normal subjects (solid symbols).

In the cerebellum as well as the cerebrum there was a similar development of the ADC. After an initial decrease of the ADC, a maximum was reached five hours post death and during the following hours the ADC decreased and reached a minimum after 19 hours with another increase of the ADC at the end of the examination.

The comparison of post mortem ADCs in the regions of the brain showed characteristic changes. There were 3 phases: an initial decrease (2 -4 h p.m.) with half life of about 1.4 h (cerebrum) to 3.9 h (cerebellum), followed by a peak with a subsequent decrease (5 - 19 h p.m.) and a late increase (19 – 23 h p.m.). There were two interesting observations. First, the lowest ADC could be measured in all tissue regions 19 h post death. Second, the ADC in the cerebellum had always the highest and in the cerebrum always the lowest values. The mean temperature of the corpses decreased during the examination from 36 °C to 25.7 °C, see Fig. 3.

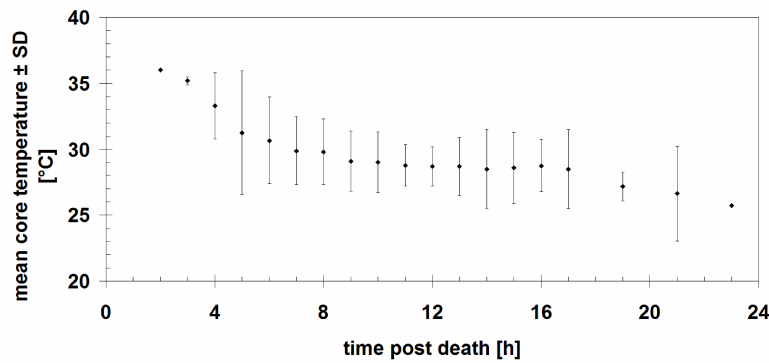


Fig. 3. Postmortal time course of the rectally measured core temperature (mean $\pm$ SD) of the 21 examined corpses during the examination period.

Ex vivo versus in vivo ADC

On a larger scale, we compared the mean ex vivo ADC at a certain time (6 h p.m.) with our in vivo control group. In the cerebrum there was a significant difference between ex vivo ADC (24.8 ± 5.0) $\cdot 10^{-5}$ mm²/s and in vivo ADC (75.1 ± 4.1) $\cdot 10^{-5}$ mm²/s ($p < 0.001$). In the thalamus and cerebellum, the difference between ex vivo and in vivo ADCs was significant, too ((36.4 ± 5.7 versus 69.9 ± 7.6) $\cdot 10^{-5}$ mm²/s, $p < 0.001$ and (46.9 ± 11.2 versus 72.3 ± 3.8) $\cdot 10^{-5}$ mm²/s, $p = 0.045$, respectively).

Discussion

As we have shown there was a characteristic postmortal course of water diffusion in human brain, which could be compared with that of ischemic stroke.

The decrease of the ADC post mortem can be explained by decreased diffusion in the intracellular space through cellular edema and destruction of cell membrane structures, as well as the change of water structure [11,12]. Additionally, the development of vacuoles, decreased blood flow and tissue acidosis cause the change of ADC [13,14].

Tarui et al showed in two cases that water diffusion in post mortem fetal brains is decreased and the ADC continued to decrease even after 8 or 19 days in contrast to adults. The earlier onset of necrosis in adult brain was made responsible for the earlier pseudonormalization after stroke [8]. The increase of ADC (19 h p.m.) in our study could be explained by autolysis which begins to destroy brain tissue immediately after death [15].

Comparing the ex vivo (averaged over 2-23 h) and reported in vivo apparent diffusion coefficients, significant differences were observed (see Fig. 4). In the cerebrum of the

corpses, the mean ADC was $(25.6 \pm 12.2) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ compared to $(80.6 \pm 4.8) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ ($p < 0.001$) or $(71.0 \pm 8.0) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ ($p = 0.012$) for in vivo brains [16,17]. The ex vivo ADC of the thalamus with $(37.3 \pm 11.9) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ was found significantly different from in vivo values of corresponding age groups as obtained by Naganawa et al (mean ADC = $(86.3 \pm 5.9) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0.003$) or by Helenius et al (mean ADC = $(76.0 \pm 5.0) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0.011$). For the cerebellum, the differences to the ex vivo ADC of $(46.1 \pm 10.9) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ were less significant (Naganawa et al $(75.0 \pm 3.4) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0.022$ and Helenius et al $(59.0 \pm 7.0) \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0.24$).

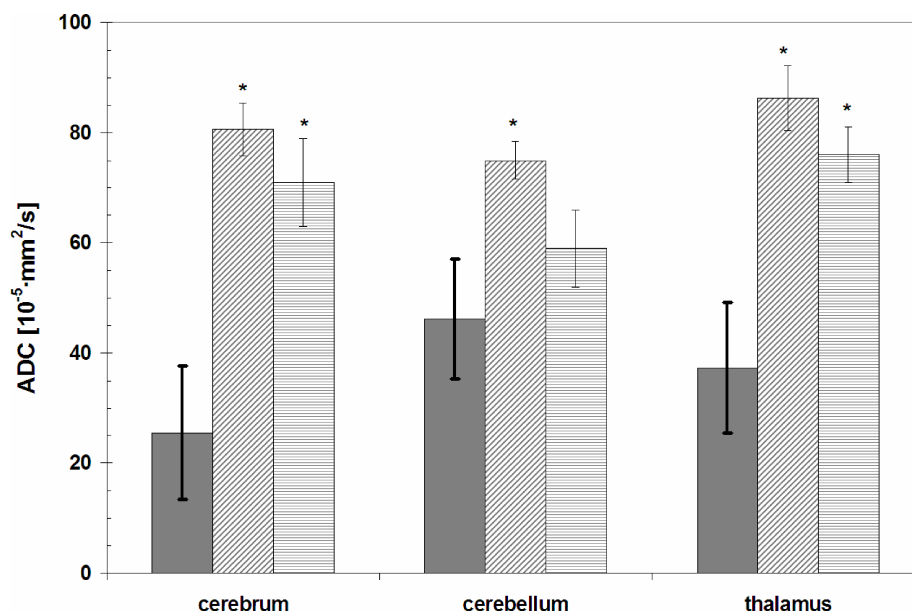


Fig. 4. Ex vivo ADC $\pm$ SD (dark bars) of the investigated brain regions compared to in vivo ADC by Naganawa et al (diagonally shaded) and Helenius et al (horizontally shaded). Stars indicate significant differences of $p < 0.025$ from ex vivo data.

Beyond a different order of magnitude between in vivo and ex vivo ADC values, our ex vivo data showed a larger variation in the three brain regions and larger differences between them, also in comparison to the few in vivo ADC values of our control group. The ex vivo ADC of the cerebellum was 80.1 % higher than that of the cerebrum. In vivo, the differences between the regions were much smaller (Naganawa et al: 6.9 %; Helenius et al: 16.9 %). This might be explained by a different susceptibility to ischemia. The ADC values of white matter increase with age because of a growing extracellular space due to the loss of neurons and pericytes as well as the changing of capillary walls [18]. Thus, the ex vivo ADC values of our study

population (mean age 71 y) might be relatively higher in comparison to younger dead. Gender differences in the corpses don't play a role above an age of 60 years. There are some limitations that should be considered in this setting. Water diffusion depends on the temperature [19]. The mean core temperature of the corpses decreased during the examination from 36 °C to 25.7 °C, which might have influenced the reduction of the ADC. But it had been shown that temperature correction of the ADC has only a minor influence [20]. The core temperature of the examined corpses decreased exceptionally slow regarding to the common nomogram. This slighter decrease might be influenced by the relatively high room temperature in the scanning room (about 23 °C) and the storage of the corpses in a closed synthetical body bag. Furthermore the rectal temperature does not represent the brain temperature which was not available and decreases faster. Another limitation was the timing of the MRI scans within 2 to 23 hours post mortem due to logistic problems. Advantageous to ex vivo DWI are less movement artifacts and longer acquisition times by using conventional diffusion-weighted spin echo sequences with less distortion [21].

It could be shown that ADC values of in vivo and ex vivo human brain differed significantly and that there was a characteristic postmortal time pattern of ADC which was similar to that after ischemic stroke. The course of ADC after death might be explained by the same cellular phenomena. Furthermore the difference of ex vivo ADCs of the examined regions was much higher than in vivo. Especially in the thalamus there was a strong decrease of ADC (55 %) from 2 to 19 h post death. Our results correlate with the findings of Scheurer et al who found a significant lower post mortem ADC of the brain, too. They even acquired lower ADC values according to our results, which can be explained by the longer post mortem interval and the lower mean core temperature of the corpses. Probably, the lower age (mean 45 years) of the corpses may lead to lower ADC values, too. In addition, our results prove the assumption that the course of the post mortem ADC is nonlinear. Combining these results there is a decrease of the ADC post mortem which is influenced by the time post death.

To improve our understanding of the course of water diffusion, the time immediately after death as well as the reproducibility has to be examined.

Conclusions

DWI of the brain can be added to the MRI methods for a post mortem imaging. With the knowledge of the ex vivo data, the determination of the time of death may be possible exploratoryly. Temperature effects will cause deviations from the obtained ex vivo data and may give hints to the storage conditions of a corpse after a crime.

Reference List

- [1] Farina J, Millana C, Fdez-Acenero MJ, Furio V, Aragoncillo P, Martin VG, Buencuerpo J. Ultrasonographic autopsy (echopsy): a new autopsy technique. *Virchows Arch.* 2002 Jun;440(6):635-9.
- [2] Thali MJ, Yen K, Schweitzer W, Vock P, Boesch C, Ozdoba C, Schroth G, Ith M, Sonnenschein M, Doernhoefer T, et al. Virtopsy, a new imaging horizon in forensic pathology: virtual autopsy by postmortem multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI)--a feasibility study. *J.Forensic Sci.* 2003 Mar;48(2):386-403.
- [3] Yen K, Vock P, Tiefenthaler B, Ranner G, Scheurer E, Thali MJ, Zwygart K, Sonnenschein M, Wiltgen M, Dirnhofer R. Virtopsy: forensic traumatology of the subcutaneous fatty tissue; multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI) as diagnostic tools. *J.Forensic Sci.* 2004 Jul;49(4):799-806.
- [4] Sumi M, Takagi Y, Uetani M, Morikawa M, Hayashi K, Kabasawa H, Aikawa K, Nakamura T. Diffusion-weighted echoplanar MR imaging of the salivary glands. *AJR Am.J.Roentgenol.* 2002 Apr;178(4):959-65.
- [5] Taouli B, Vilgrain V, Dumont E, Daire JL, Fan B, Menu Y. Evaluation of liver diffusion isotropy and characterization of focal hepatic lesions with two single-shot echo-planar MR imaging sequences: prospective study in 66 patients. *Radiology* 2003 Jan;226(1):71-8.
- [6] Matoba M, Tonami H, Kondou T, Yokota H, Higashi K, Toga H, Sakuma T. Lung carcinoma: diffusion-weighted mr imaging--preliminary evaluation with apparent diffusion coefficient. *Radiology* 2007 May;243(2):570-7.
- [7] Fiehler J, Foth M, Kucinski T, Knab R, von BM, Weiller C, Zeumer H, Rother J. Severe ADC decreases do not predict irreversible tissue damage in humans. *Stroke* 2002 Jan;33(1):79-86.

- [8] Tarui T, Khwaja OS, Estroff JA, Robinson JN, Grant PE. Fetal MR Imaging Evidence of Prolonged Apparent Diffusion Coefficient Decrease in Fetal Death. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 2010 Nov 24.
- [9] Roelants-van Rijn AM, Nikkels PG, Groenendaal F, van Der GJ, Barth PG, Snoeck I, Beek FJ, de Vries LS. Neonatal diffusion-weighted MR imaging: relation with histopathology or follow-up MR examination. *Neuropediatrics* 2001 Dec;32(6):286-94.
- [10] Penrose LS. Measurement of pleiotropic effects in phenylketonuria. *Ann.Eugen.* 1951 Sep;16(2):134-41.
- [11] Pierpaoli C, Righini A, Linfante I, Tao-Cheng JH, Alger JR, Di CG. Histopathologic correlates of abnormal water diffusion in cerebral ischemia: diffusion-weighted MR imaging and light and electron microscopic study. *Radiology* 1993 Nov;189(2):439-48.
- [12] Unger E, Littlefield J, Gado M. Water content and water structure in CT and MR signal changes: possible influence in detection of early stroke. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 1988 Jul;9(4):687-91.
- [13] Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 1996 Sep;27(9):1641-6.
- [14] Hoehn-Berlage M, Norris DG, Kohno K, Mies G, Leibfritz D, Hossmann KA. Evolution of regional changes in apparent diffusion coefficient during focal ischemia of rat brain: the relationship of quantitative diffusion NMR imaging to reduction in cerebral blood flow and metabolic disturbances. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 1995 Nov;15(6):1002-11.
- [15] Krause D. Leichenerscheinungen und Todeszeitbestimmung. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin.* 1 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2004. p. 150.
- [16] Naganawa S, Sato K, Katagiri T, Mimura T, Ishigaki T. Regional ADC values of the normal brain: differences due to age, gender, and laterality. *Eur.Radiol.* 2003 Jan;13(1):6-11.

- [17] Helenius J, Soinne L, Perkio J, Salonen O, Kangasmaki A, Kaste M, Carano RA, Aronen HJ, Tatlisumak T. Diffusion-weighted MR imaging in normal human brains in various age groups. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 2002 Feb;23(2):194-9.
- [18] Nusbaum AO, Tang CY, Buchsbaum MS, Wei TC, Atlas SW. Regional and global changes in cerebral diffusion with normal aging. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 2001 Jan;22(1):136-42.
- [19] Le Bihan D, Delannoy J, Levin RL. Temperature mapping with MR imaging of molecular diffusion: application to hyperthermia. *Radiology* 1989 Jun;171(3):853-7.
- [20] Scheurer E, Lovblad KO, Kreis R, Maier SE, Boesch C, Dirnhofer R, Yen K. Forensic application of postmortem diffusion-weighted and diffusion tensor MR imaging of the human brain in situ. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 2011; 32:1518-1524.
- [21] Dyrby TB, Baare WF, Alexander DC, Jelsing J, Garde E, Sogaard LV. An ex vivo imaging pipeline for producing high-quality and high-resolution diffusion-weighted imaging datasets. *Hum.Brain Mapp.* 2011 Apr;32(4):544-63.

Postmortem ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of the skeletal muscle: α -ATP/ P_i ratio as a forensic tool?

Tony M. Schmidt¹, Zhiyue J. Wang², Sarah Keller¹, Axel Heinemann³, Suzan Acar¹, Joachim Graessner⁴, Bjoern P. Schoennagel¹, Gerhard Adam¹, Roland Fischer^{5,6}, Jin Yamamura¹

University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

Martinistraße 52

20246 Hamburg, Germany

Telephone Number: ++49 40 74105 8880

Fax Number: ++49 40 74105 3802

Email: tonymanfred.schmidt@gmail.com

¹ Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

² Department of Radiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

³ Department of Legal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

⁴ Siemens AG, Hamburg, Germany

⁵ Children's Hospital & Research Center Oakland, Oakland CA, USA

⁶ Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany.

Abstract

Purpose

Phosphor magnetic resonance spectroscopy (^{31}P MRS) is an established method for metabolic examinations of resting and exercising skeletal muscle. So far, there are few MRS investigations of human corpses. The aim of this study was to investigate the temporal postmortem pattern of phosphor metabolites in the adductor magnus muscle and to check the value of MRS as a forensic tool, especially for the determination of the time of death.

Material and Methods

Eight corpses, died of natural cause, were examined (5 male, 3 female; age: 73 ± 7 y, weight 65.8 ± 15.9 kg). A control group of 3 subjects (2 male, 1 female, mean age: 51 ± 24 y, range: 24 – 69 y, mean body weight: 84.0 ± 16.5 kg) was examined at a single time point as well. ^{31}P MRS was performed on a 1.5 T MRI (TR 700 ms, TE 0.35 ms, averages 256, flip angle 90°). A standard $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ heart/liver coil was employed (receiver coil diameter 12 cm). The ^{31}P MRS scans were repeated in intervals of one hour over a period from 4.5 to 24 h postmortem (p.m.). The core temperature was rectally measured throughout the MRI examination.

Results

The mean core temperature decreased from 36.0°C to 25.7°C . In vivo and ex vivo spectra showed characteristic differences, especially the PCr metabolite was no longer detectable after 10 hours p.m. The $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio decreased with time from 0.445 to 0.032 over 24 hours p.m.

Conclusion

There is a characteristic postmortem time pattern of the phosphor metabolites. Especially the acquired $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio could be described by a significant exponential time course ($r^2 = 0.92$, $p < 0.001$). ^{31}P MRS might be added to the postmortem imaging methods.

Keywords

time of death

forensic

postmortem
spectroscopy
³¹P MRS
magnetic resonance imaging

Introduction

³¹P magnetic resonance spectroscopy (³¹P MRS) was clinically used on skeletal muscle of human subjects in the early 1980s. It is a unique, noninvasive tool to determine energy metabolism through quantification of phosphor metabolites [1]. In later studies, also other organs than the muscle, e.g. the brain, the prostate and the liver, were examined [2-4]. Using this technique, the constitution of tissues can be assessed noninvasively and metabolites can be quantified over a specific period [5,6].

Glycolytic pathway plays a key role in skeletal muscle energy metabolism by converting glucose to pyruvate to generate Adenosine triphosphate (ATP) [7,8]. Under aerobic conditions pyruvate is then oxidized to H₂O and CO₂ via tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation. Under anaerobic conditions e.g. at the beginning of skeletal muscle contraction or after cardiovascular arrest, pyruvate is catabolized to lactic acid resulting in muscle acidification due to accumulation of hydrogen ions [9]. Additionally ATP is regenerated via transfer of phosphate from creatine phosphate to ADP catalysed in a reversibly reaction by creatine kinase, which was shown to be increased immediately upon death followed by rapid degradation [10-12].

With the onset of death and the consumption of myoglobin as oxygen storage, there is no further oxygen supply of the muscle. But ATP is still synthesized for a period of times, first by PCr reaction later from glycogen [13]. PCr decreases after cardiovascular arrest and Pi increases. In vivo and ex vivo ATP concentrations of blood were reported to differ and the ATP concentration in the calf muscle of rats decreased postmortem [14,15]. The temporal pattern of the postmortem ATP concentration depends on the glycogen and PCr reserve at the onset of death, as well as the period of anoxia. ATP is the essential metabolite for the muscle contraction and the rigor mortis, respectively. The rigor starts when the ATP level decreased fewer than 85 % of the in vivo level. There are four different rigor types which are influenced by the energy reserve, the cause of death and the temperature

[16-18]. In opposite to ADP and AMP, the ATP concentration correlates with the course of rigor mortis.

Radiological imaging could play a significant role in the forensic medicine by adding important information [19]. Magnetic resonance imaging (MRI) was introduced in the forensic medicine as a second line tool, especially for identifying soft tissue injuries [20,21]. It is especially suited for analyzing head and brain injuries, detecting edema within the brain parenchyma or identifying pulmonary thromboembolism and myocardial infarction [22-24].

Despite of the increasing role of the magnetic resonance imaging in postmortem forensic investigations there have been only a few MRS examinations of human corpses so far, but in animals, especially in rats and rabbits [25]. ^1H MRS of animal brain was used to determine the time of death [26,27].

The current standard for the estimation of the time of death in the early post mortem interval is the measurement of the body core temperature. It is acquired with a rectal thermometer. The temperature has to be correlated with the body weight of the corpse as well as the ambient temperature. Then the time of death can be estimated with a normogram. It is a practicable method but there are several limitations, e.g. changing ambient temperature.

It had been shown that there is a decrease of the ATP concentration after death using high performance liquid chromatography [14]. Animal trials showed that there is a decrease of ATP over time which is influenced by the cause of death [28]. If a characteristic postmortem pattern of phosphor metabolites can be detected by MRS, this technique could play a significant role in the assessment of the time of death.

The aim of this study was to evaluate the postmortem metabolite changes, to compare them to in vivo muscle and to assess the role of ex vivo ^{31}P MRS as a forensic tool.

Material and Methods

Patients

Eight corpses (5 male, 3 female, mean age: 73 ± 7 y, mean weight 65.8 ± 15.9 kg), died of natural cause (myocardial infarction, pneumonia, sepsis, malignant tumours), were examined. The corpses were not matched concerning the gender and they were stored at room temperature until the scanning. MRI scans were performed with scan intervals of one hour over a period from 4.5 to 24 h postmortem. The scans

were started as early as possible after death. There were different initial acquisition times for the examined subjects. The time of death was defined as the point in time when death was declared by a physician. The scans were performed at the weekend free of routine diagnostics. The core temperature was measured using a digital rectal thermometer outside the scanning room. Therefore, the examined area had to be localized each time due to repositioning for each acquisition scan. To check the comparability of the acquired ex vivo results with in vivo ones, a control group of 3 subjects (2 male, 1 female, mean age: 51 ± 24 y, range: 24 – 69 y, mean body weight: 84.0 ± 16.5 kg) was examined as well. The study protocol was approved by the local Ethics Committee, and informed consent was obtained from all relatives and the control subjects.

³¹P MRS protocol

MRS was performed on a 1.5 T whole body MR scanner (Magnetom Symphony; Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Germany) by using a standard ³¹P/¹H double resonant surface coil (quadratic 27x27 cm² transmission coil, circular polarized receiver coil: diameter 12 cm), which was placed under the thigh of the corpses. ³¹P spectra at 25.7 MHz could be acquired from a detection volume of about 6 cm tissue depth. For the localization of the adductor magnus muscle transverse, sagittal and coronary ¹H localizer scans were performed. A free induction decay sequence (muscle_fid_noe) exploiting the Nuclear Overhauser Effect was used with a repetition time of 700 ms, an echo time of 0.35 ms, a flip angle of 90° and with 256 averages.

Spectral analysis and Statistics

The acquired spectra, which had to be first converted to a frequency domain text file by an in-house software, were analyzed using the ACD/NMR Processor Academic Edition (Version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, Canada). After baseline correction, the area of each identifiable metabolite peak was determined by mixed Gauss-Lorentz curve fitting. Since no external phantom standard was used, only relative metabolite concentrations could be calculated mostly as ratio of the inorganic phosphate peak (Pi).

Parametric statistics (arithmetic mean value $\pm$ standard deviation (SD), Pearson correlation coefficient r was used throughout this work. The relationship between

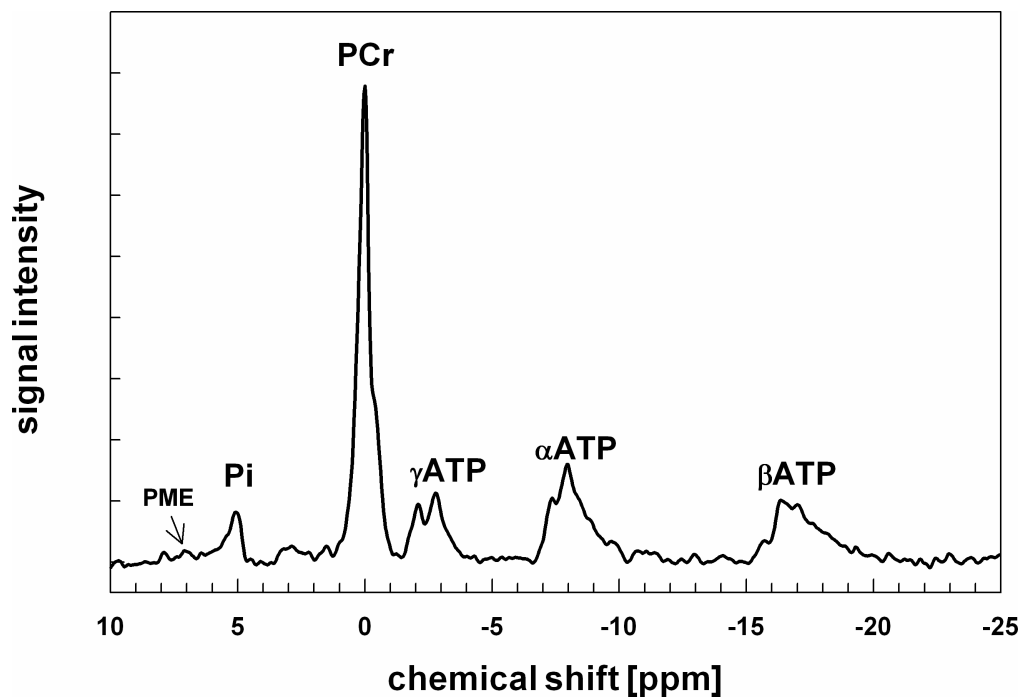
ATP/Pi ratios and time p. m. was fitted by exponential functions using the Levenberg-Marquardt algorithm with the coefficient of determination (r^2) as figure of merit.

Results

Ex vivo versus in vivo MRS

The comparison of ex vivo and in vivo spectra of the adductor magnus muscle showed characteristic differences. In opposite to in vivo spectra, the ex vivo spectra were dominated by the inorganic phosphate (Pi) peak which was used for further analyses. The ex vivo phosphocreatine (PCr) signal was either very small or even not detectable (see Figure 1) depending on the time postmortem.

a)



b)

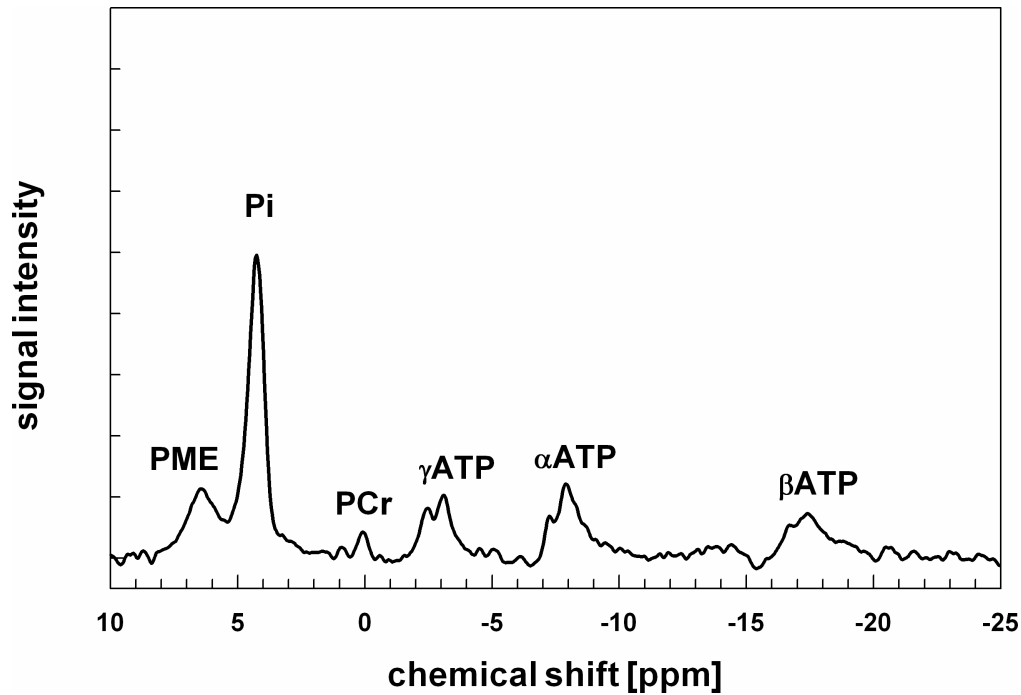


Fig. 1. Comparison of exemplary in vivo (1a) and ex vivo (1b: 4.5 hours postmortem) ³¹P MR spectra from a single subject in the adductor magnus muscle.

During the investigated period, the ex vivo peaks showed similar chemical shifts compared to the in vivo spectra (PCr, γ -ATP, α -ATP, β -ATP: 0.34 ± 0.11 , -2.01 ± 0.12 , -7.08 ± 0.16 , -15.43 ± 0.37 ppm). However, the Pi peak shifted from 5.18 ± 0.13 ppm (in vivo) by about 1.0 ppm and 1.5 ppm after 5 and 10 hours p. m., respectively. Table 1 shows that ex vivo ratios are systematically lower than in vivo ratios except the phosphomonoester (PME)/ β -ATP ratio. The α -, β -, γ -ATP/Pi and the PCr/Pi ex vivo ratios decrease from the beginning of the measurement to the end, while the PME/ β -ATP ratio is exponentially increasing with a slope of $0.39 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.54$).

The mean core temperature decreased throughout the MRI examination from 36 °C to 25.7 °C. No significant linear correlation with the Pi peak shift was observed, but a negative correlation with the PME/ β -ATP ratio ($r = -0.7$, $p < 0.01$). The obtained in vivo PCr/ β -ATP ratio of the thigh adductors was 4.8 ± 2.6 and can be compared with the data of corresponding muscle groups of other authors (M. quadriceps femoris: 4.2 ± 0.7 , 4.5 ± 0.2) [29,30].

Table 1. Demographics and ratios of ^{31}P metabolites relative inorganic phosphor or β -ATP of in vivo patients (n = 3) and corpses (n = 8) in the initial time interval (4.5 – 7.5 hours postmortem).

in vivo			ex vivo	
	mean	SD	mean	SD
age	50,7	23,6	73,0	7,3
BMI	27,7	4,9	23,1	4,1
			initial time interval	
α -ATP/Pi	2,24	0,63	0,19	0,13
β -ATP/Pi	2,01	0,57	0,15	0,10
γ -ATP/Pi	1,80	0,45	0,15	0,11
PCr/Pi	8,63	1,66	0,03	0,02
PCr/ β -ATP	4,79	2,57	nd	nd
PME/ β -ATP	0,10	0,12	1,99	1,53

Postmortem course of ^{31}P metabolite ratios

The mean α -ATP/Pi ratio decreased with time (t) from 0.445 (4 h p.m.) to 0.032 (24 h p.m.), see Figure 2. The data could be described by a mono-exponential function: α -ATP/Pi = C · exp[-(0.42±0.07)·t] + (0.02±0.05) with a highly significant coefficient of determination ($r^2 = 0.92$, $p < 0.001$). The above intercept C = 2.19 ± 0.12 at t = 0 h agrees with the in vivo α -ATP/Pi ratio of the 3 controls, C = 2.2 ± 0.6.

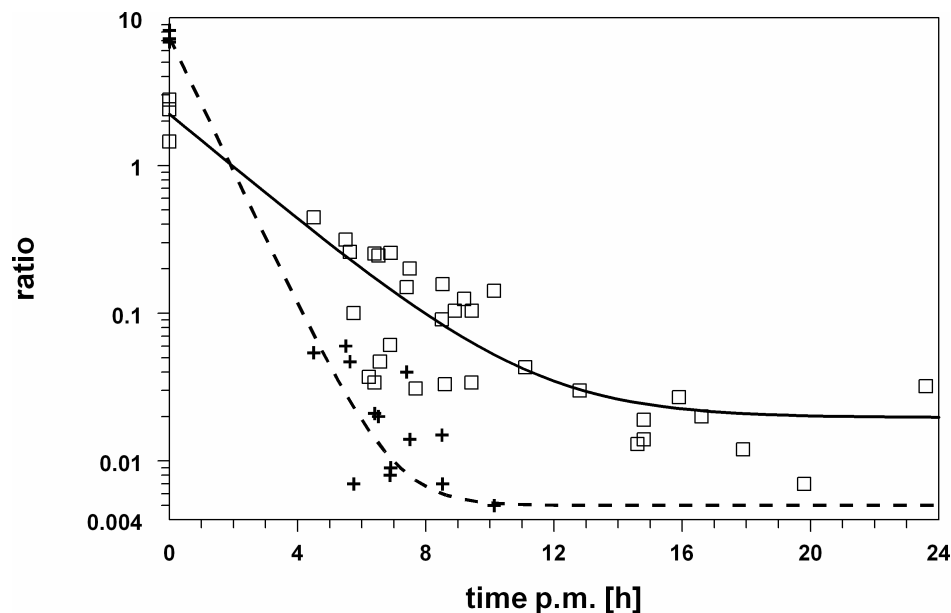


Fig. 2. Temporal pattern of the postmortem metabolite ratios α -ATP/Pi (squares, solid line: $r^2 = 0.91$) and PCr/Pi (crosses, dashed line: $r^2 = 0.99$) from 8 corpses. At t = 0 there are in vivo ratios from 3 healthy subjects.

From the obtained mono-exponential function of Figure 2, we derived the inverse function for the time postmortem, time p. m. = $-\ln((\alpha\text{-ATP}/\text{Pi} - 0.02) / 2.19) / 0.42$, and similarly for the 95% confidence interval (see Figure 3). Thus, a measured $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio of 1.0 determines the time of death within 1.4 to 2.5 h p. m., while a ratio of only 0.1 increases the 95% time interval from 5.7 to 12.8 h p. m.

During the period to 10 h postmortem $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$, $\beta\text{-ATP}/\text{Pi}$ and $\gamma\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratios showed a similar temporal pattern. Only the PCr/Pi ratio differed systematically from the other ratios (see Figure 2). The $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio was the only one which could be determined over a longer postmortem interval (> 10 h p. m.).

The in vivo $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio seems ($n = 3!$) to be negatively determined by the BMI of the subjects (linear regression: $r^2 = 0.9994$). The BMI also affects ex vivo $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ ratio beyond the time postmortem. A linear bi-variate regression results in negative regression coefficients for the time p. m. ($-0.036 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$) and the BMI ($-0.005 \pm 0.006 \text{ m}^2/\text{kg}$), respectively ($r = 0.56$, $p = 0.034$).

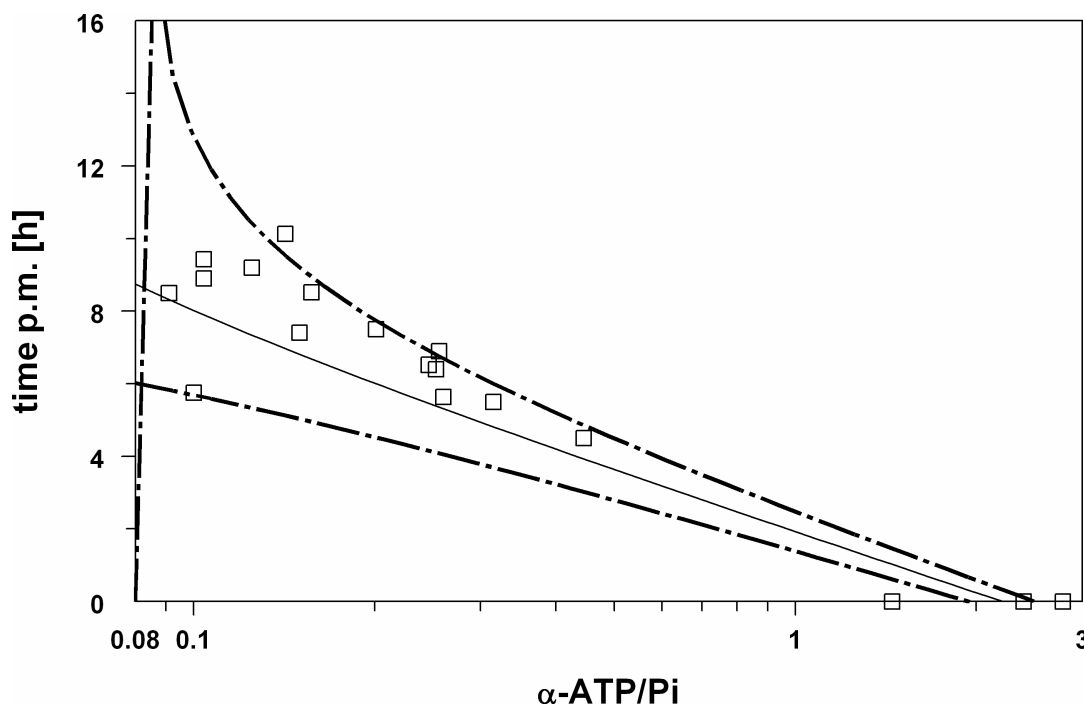


Fig. 3. Inverse function from figure 2 of the postmortem metabolite ratios $\alpha\text{-ATP}/\text{Pi}$ (squares, thin solid line) allows the determination of the death time point within its 95% confidence interval (dot-dashed lines).

Discussion

With the onset of death ATP is synthesized for a period of times, first by PCr reaction later from glycogen [13]. PCr decreases after cardiovascular arrest and Pi increases. Our results agree with that fact, what is shown with the decreasing postmortem PCr/Pi ratio.

During the investigated postmortem period the above mentioned ATP synthesis seemed to be broken down. The characteristic postmortem Pi increase is caused by the hydrolysis of ATP. The ex vivo muscle showed relatively higher Pi concentrations compared to ATP and that is why α -ATP/Pi ratio is reduced. Similar decreased α -ATP/Pi ratios can be found in vivo due to ischemia of skeletal muscle.

There are different metabolite ratios (PCr/ATP, ATP/Pi) to characterize the metabolic state of tissues.

The ex vivo β -ATP resonance could only be analyzed reliably until 10 h p. m. There was no significant difference between the β -ATP/Pi ratio and the α -ATP/Pi ratio, however, α -ATP could be analyzed over a larger time period. In several works this peak is not used for the quantification because α -ADP is involved in the development of that resonance [31]. But the ADP concentration in resting muscle is only in the range of tens of micromoles [32].

The shift of the ex vivo Pi peak is affected by pH changes, and is a term of increasing tissue acidosis. The PCr peak remains constant because it is not affected by pH changes.

There are some limitations that should be considered in this setting. The α -ATP resonance is influenced by α -ADP but it is longer detectable than other signals. To achieve the best comparability of the acquired data, MRS should be performed in a definite muscle because the ATP concentration varies between different muscle groups [33]. The reproducibility of the results may be influenced, due to repositioning after acquiring the body temperature out of the examination room. But it was always the same muscle identified and used for data acquisition. There are interindividual differences of the ATP concentration due to circadian rhythm of insulin and glucose levels [5]. The influence of fasting and diet was not clear in this study [34,35]. The cause of death and the period of anoxia influences the postmortem decrease of ATP, we did not match the corpses by the cause of death. Additionally, the physical constitution of a person, e.g. the composition of muscle fibres as well as the BMI, influences the results. Despite a variation of only 5-10% in skeletal muscle fibre

composition between different human individuals and the fact that – in contrary to mammals - most of human skeletal muscle is mixed, a residual influence of the different metabolic patterns of fast-twitching, anaerobic type II and slow- twitching type I fibres should be taken into account, considering the different metabolite levels of glycogen and PCr in each fibre type [36]. According to this, fast-twitching skeletal muscle exhibits higher PCr/ATP and PCr/Pi ratios and may be more resistant to anaerobia induced lactic acidosis and declined oxidative metabolism in the time course of death [37-39]. How we could show, the in vivo α -ATP/Pi ratio is negatively determined by the BMI of the subjects (linear regression: $r^2 = 0.9994$). Beyond the time post-mortem, also the BMI affects the ex vivo α -ATP/Pi ratio. A linear bi-variate regression results in negative regression coefficients for the time p. m. ($-0.036 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$) and the BMI ($-0.005 \pm 0.006 \text{ m}^2/\text{kg}$), respectively ($r = 0.56$, $p = 0.034$).

The depletion of ATP is known to be influenced by the temperature. The mean core temperature of the corpses decreased during the examination from 36 °C to 25.7 °C. The low body temperatures led to decreased enzyme activity and slower depletion of ATP. Additionally the core temperature and the temperature of the thigh muscle may differ.

Compared to the measurement of the body core temperature which is the current gold standard for estimating the time of death postmortem MRS has several disadvantages. An enormous technical effort is necessary e.g. to support forensic institutes with MR scanners. The body core temperature method is improved over years and can be adapted to different environment conditions. There are only few studies about postmortem MRS, the reproducibility of the data has to be confirmed by further studies.

Conclusion

The acquired α -ATP/Pi ratio showed a significant exponential postmortem time course. Under experimental standardized conditions, its inverse logarithmic function allows the determination of the time of death up to 8 hours postmortem within a 95% confidence interval. A measured α -ATP/Pi ratio of 1.0 determines the time of death within 1.4 to 2.5 h p. m., while a ratio of only 0.1 increases the 95% time span from 5.7 to 12.8 h p. m. Thus, ^{31}P MRS might be added to the postmortem imaging methods, however the reproducibility and the temperature influence have to be

investigated in more depth and an external ^{31}P phantom standard should be added in further studies.

Reference List

- [1] Ingwall JS. Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of cardiac and skeletal muscles. *Am J Physiol* 1982;242(5):H729-H744.
- [2] Reyngoudt H, Paemeleire K, Descamps B, De DY, Achten E. ³¹P-MRS demonstrates a reduction in high-energy phosphates in the occipital lobe of migraine without aura patients. *Cephalalgia* 2011.
- [3] Macdonald JM, Kurhanewicz J, Dahiya R et al. Effect of glucose and confluency on phosphorus metabolites of perfused human prostatic adenocarcinoma cells as determined by ³¹P MRS. *Magn Reson Med* 1993;29(2):244-248.
- [4] Wylezinska M, Cobbold JF, Fitzpatrick J et al. A comparison of single-voxel clinical in vivo hepatic ³¹P MR spectra acquired at 1.5 and 3.0 Tesla in health and diseased states. *NMR Biomed* 2011;24(3):231-237.
- [5] Layec G, Bringard A, Le FY et al. Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A ³¹P-MRS study. *Magn Reson Med* 2009;62(4):840-854.
- [6] Hug F, Bendahan D, Le FY, Cozzzone PJ, Grelot L. Metabolic recovery in professional road cyclists: a ³¹P-MRS study. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37(5):846-852.
- [7] Greiner A, Esterhammer R, Pilav S et al. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle during moderate isotonic exercise under different degrees of cuff compression: a phosphorus ³¹ magnetic resonance spectroscopy study. *J Vasc Surg* 2005;42(2):259-267.
- [8] Laaksonen MS, Kalliokoski KK, Kyrolainen H et al. Skeletal muscle blood flow and flow heterogeneity during dynamic and isometric exercise in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(3):H979-H986.
- [9] Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(3):R502-R516.

- [10] Henckel P, Karlsson A, Jensen MT et al. Metabolic conditions in Porcine longissimus muscle immediately pre-slaughter and its influence on peri- and postmortem energy metabolism. *Meat Sci.* 2002 Oct;62(2):145-55.
- [11] Lametsch R, Roepstorff P, Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem.* 2002 Sep 25;50(20):5508-12.
- [12] Jia X, Ekman M, Grove H et al. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J Proteome Res.* 2007 Jul;6(7):2720-31. Epub 2007 Jun 14.
- [13] Needham D. *Machina carnis: The biochemistry of muscular contraction in its historical development.* Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- [14] Huang H, Yan Y, Zuo Z et al. Determination of adenosine phosphates in rat gastrocnemius at various postmortem intervals using high performance liquid chromatography. *J Forensic Sci* 2010;55(5):1362-1366.
- [15] Sugie H, Nishikawa T, Funao T. Quantitation of nucleotides, nucleosides and bases in antemortem and postmortem bloodstains by high-performance liquid chromatography. *Forensic Sci Int* 1995;71(2):123-130.
- [16] Krompecher T, Fryc O. Experimental evaluation of rigor mortis. IV. Change in strength and evolution of rigor mortis in the case of physical exercise preceding death. *Forensic Sci Int* 1978;12(2):103-107.
- [17] Krompecher T, Bergerioux C, Brandt-Casadevall C, Gujer HR. Experimental evaluation of rigor mortis. VI. Effect of various causes of death on the evolution of rigor mortis. *Forensic Sci Int* 1983;22(1):1-9.
- [18] Krompecher T. Experimental evaluation of rigor mortis. V. Effect of various temperatures on the evolution of rigor mortis. *Forensic Sci Int* 1981;17(1):19-26.
- [19] Farina J, Millana C, Fdez-Acenero MJ et al. Ultrasonographic autopsy (echopsy): a new autopsy technique. *Virchows Arch* 2002;440(6):635-639.

- [20] Jackowski C, Warntjes MJ, Kihlberg J et al. Quantitative MRI in isotropic spatial resolution for forensic soft tissue documentation. Why and how? *J Forensic Sci.* 2011 Jan;56(1):208-15.
- [21] Yen K, Vock P, Tiefenthaler B et al. Virtopsy: forensic traumatology of the subcutaneous fatty tissue; multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI) as diagnostic tools. *J Forensic Sci* 2004;49(4):799-806.
- [22] Thali MJ, Yen K, Schweitzer W et al. Virtopsy, a new imaging horizon in forensic pathology: virtual autopsy by postmortem multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI)--a feasibility study. *J Forensic Sci* 2003;48(2):386-403.
- [23] Jackowski C, Grabherr S, Schwendener N et al. Pulmonary thrombembolism as cause of death on unenhanced postmortem 3T MRI. *Eur Radiol.* 2013 May;23(5):1266-70.)
- [24] Jackowski C, Hofmann K, Schwendener N et al. Coronary thrombus and peracute myocardial infarction visualized by unenhanced postmortem MRI prior to autopsy. *Forensic Sci Int.* 2012 Jan 10;214(1-3)
- [25] Hirakawa K, Koike K, Uekusa K, Nihira M, Yuta K, Ohno Y. Experimental estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR metabolic data. *Legal Medicine*:2009;11:S282-S285.
- [26] Scheurer E, Ith M, Dietrich D et al. Statistical evaluation of time-dependent metabolite concentrations: estimation of post-mortem intervals based on in situ 1H-MRS of the brain. *NMR Biomed.* 2005 May;18(3):163-72.
- [27] Banaschak S, Rzanny R, Reichenbach JR et al. Estimation of postmortem metabolic changes in porcine brain tissue using 1H-MR spectroscopy--preliminary results. *Int J Legal Med.* 2005 Mar;119(2):77-9.
- [28] Gotohda M, Harada H. Application of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to legal medicine--ATP quantitation in tissue with 31P-NMR. *Tokushima J Exp Med* 1993;40(1-2):61-68.

- [29] McCully KK, Turner TN, Langley J, Zhao Q. The reproducibility of measurements of intramuscular magnesium concentrations and muscle oxidative capacity using ³¹P MRS. *Dyn Med* 2009;8:5.
- [30] Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed* 2007;20(6):555-565.
- [31] Hoffenberg EF, Kozlowski P, Salerno TA, Deslauriers R. Evaluation of cardiac ³¹P magnetic resonance spectroscopy: reviewing NMR principles. *J Surg Res* 1996;62(1):135-143.
- [32] Prompers JJ, Jeneson JA, Drost MR, Oomens CC, Strijkers GJ, Nicolay K. Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics. *NMR Biomed* 2006;19(7):927-953.
- [33] Kobayashi M, Takatori T, Iwadate K, Nakajima M. Reconsideration of the sequence of rigor mortis through postmortem changes in adenosine nucleotides and lactic acid in different rat muscles. *Forensic Sci Int* 1996;82(3):243-253.
- [34] Miller RG, Carson PJ, Moussavi RS et al. Factors which influence alterations of phosphates and pH in exercising human skeletal muscle: measurement error, reproducibility, and effects of fasting, carbohydrate loading, and metabolic acidosis. *Muscle Nerve* 1995;18(1):60-67.
- [35] Lunt JA, Allen PS, Brauer M et al. An evaluation of the effect of fasting on the exercise-induced changes in pH and Pi/PCr from skeletal muscle. *Magn Reson Med* 1986;3(6):946-952.
- [36] Argov Z, Löfberg M, Arnold DL. Insights into muscle diseases gained by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve*. 2000 Sep;23(9):1316-34.
- [37] Meyer RA, Brown TR, Kushmerick MJ. Phosphorus nuclear magnetic resonance of fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol*. 1985 Mar;248(3 Pt 1):C279-87.

- [38] Kushmerick MJ, Moerland TS, Wiseman RW. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7521-7525.
- [39] Takahashi H, Kuno SY, Katsuta S et al. Relationships between fiber composition and NMR measurements in human skeletal muscle. *NMR Biomed.* 1996 Feb;9(1):8-12.

5. Diskussion

5.1 Diffusionsgewichtete Bildgebung des Gehirns

Das menschliche Gehirn dient der Verarbeitung von Sinneseindrücken, der Koordination von Bewegungsabläufen und Verhaltensweisen sowie der Speicherung und Bewertung von Informationen. Es ist gleichzeitig Manifestationsort verschiedener Erkrankungen. In den Industrienationen treten vor allem vaskuläre Erkrankungen, wie der ischämische Schlaganfall, aber auch degenerative und chronisch entzündliche Erkrankungen (Alzheimer Demenz, Multiple Sklerose) auf. Auch neoplastische Erkrankungen des Gehirns (Glioblastom, Meningeom) sind häufig. Aufgrund der schwerwiegenden Konsequenzen dieser Erkrankungen ist eine frühzeitige und präzise Diagnose von besonderer Bedeutung.

Als diagnostisches Mittel der Wahl bei zahlreichen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems hat sich, aufgrund des hohen Weichgewebskontrastes, die Magnetresonanztomographie etabliert. Insbesondere die diffusionsgewichtete Bildgebung ermöglicht die Identifikation ischämischer Areale schon in der akuten Phase des Schlaganfalls.³⁰ Dank dieses Verfahrens ist es möglich, zahlreiche Krankheitsbilder gezielter zu therapieren und den Therapieerfolg zu kontrollieren. Ziel dieser Arbeit war es, die postmortalen Veränderungen des ADC zu ermitteln, diese mit In-vivo-Werten zu vergleichen und die Rolle der DWI als forensisches Hilfsmittel zu bewerten.

Wie bereits gezeigt werden konnte, gab es einen charakteristischen postmortalen Verlauf des Diffusionskoeffizienten im menschlichen Gehirn, der mit dem des Schlaganfalls verglichen werden kann. Nach einem Schlaganfall erfolgt in den ischämischen Regionen ein initialer Abfall des ADC über 24 Stunden.³¹ Srivastava et al. beschreiben einen 41% niedrigeren ADC ($63,2 \pm 20,9 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ innerhalb der ersten 12 Stunden) als in der kontralateralen Hemisphäre.³² Andere Quellen berichten, dass der minimale ADC zwischen 28 h und 4 Tagen nach dem ischämischen Ereignis erreicht ist.^{33, 34} Ein Anstieg der Diffusion, genannt Pseudonormalisierung, folgt innerhalb von 3 – 10 Tagen (Mittelwert 6,61 d). Aufgrund dieses Wiederanstiegs ist der ADC in der späten subakuten Phase ($38 \pm 10,7 \text{ d}$) 12 % höher als in normalem Hirngewebe.³²

Die akute Reduktion des ADC wird durch verminderte Diffusion im Intrazellularraum hervorgerufen. Verantwortlich hierfür ist der Untergang von Membranstrukturen und ein zelluläres Ödem,³⁵ das durch erhöhte Membranpermeabilität und das Einströmen von Wasser in den Intrazellularraum entsteht. Pathophysiologische Grundlage hierfür ist der verminderte Blutfluss, der zum Zusammenbruch des Metabolismus, Ionenpumpendefekten und Membrandepolarisation führt. Auch Tierversuche haben gezeigt, dass Membranuntergang und Zelllyse für den Abfall des ADC verantwortlich sind.^{36, 37} Außerdem zeigten Tierversuche, dass Veränderungen an Vakuolen von Axonen und Glia 0,5 bis 6 h nach einem Infarkt eine Schwellung des Cytoplasmas hervorrufen, die die Veränderung des ADC erklärt.³⁸ Darüber hinaus ist der Zusammenhang zwischen vermindertem Blutfluss und verringerten ADC-Werten bekannt. In ischämischem Gewebe mit vermindertem Blutfluss können reduzierte ADC-Werte gemessen werden. Des Weiteren ist der ADC bei Laktatazidose verringert.³⁹ Verantwortlich für die Pseudonormalisierung hingegen ist das Einsetzen der Nekrose sowie ein höherer Wassergehalt im Extrazellularraum (vasogenes Ödem).⁴⁰

Der zeitliche Verlauf des ADC in den Post-mortem-Untersuchungen dieser Studie könnte durch dieselben zellulären Phänomene erklärt werden, die auch zu einem verringerten ADC innerhalb der ersten 24 h nach einem Schlaganfall führen. Der Einfluss der Pseudonormalisierung jedoch konnte innerhalb des Untersuchungszeitraumes (2 – 23 h p.m.) nicht geprüft werden.

Tarui et al. haben gezeigt, dass der postmortale ADC im Gehirn von Feten auch nach 8 beziehungsweise 19 Tagen post mortem noch verringert ist. Das frühere Einsetzen der Nekrose im Gehirn von Erwachsenen wurde für die frühere Pseudonormalisierung verantwortlich gemacht. Bei Feten sind die für den Zelltod verantwortlichen Prozesse noch nicht vollständig entwickelt, deshalb benötigen diese länger für die Aktivierung.⁴¹ Der Anstieg des ADC in unseren Untersuchungen (19 h p.m.) kann durch Autolyse erklärt werden, die unmittelbar nach dem Tod beginnt, Gehirngewebe zu zerstören.⁴²

Im Vergleich der Ex-vivo-Werte (gemittelt über 2 – 23 h p.m.) mit In-vivo-Werten aus der Literatur zeigten sich charakteristische Unterschiede (Schmidt T et al. 2012; Abbildung 4). Der mittlere Ex-vivo-ADC des Großhirns betrug $(25,6 \pm 12,2) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ gegenüber einem In-vivo-ADC entsprechender Altersgruppen von $(80,6 \pm 4,8) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ ($p < 0,001$) beziehungsweise $(71,0 \pm 8,0) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ ($p = 0,012$).^{43, 44}

Der Ex-vivo-Diffusionskoeffizient des Thalamus von $(37,3 \pm 11,9) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ unterschied sich signifikant von den In-vivo-ADC-Werten, die von Naganawa et al. $((86,3 \pm 5,9) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s})$ $p = 0,003$ und Helenius et al. $((76,0 \pm 5,0) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s})$ $p = 0,011$ genannt werden.^{43, 44}

Für das Kleinhirn waren die Unterschiede zwischen Ex-vivo-ADC $(46,1 \pm 10,9) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ und In-vivo-ADC weniger signifikant (Naganawa et al. $(75,0 \pm 3,4) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0,022$ und Helenius et al. $(59,0 \pm 7,0) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$, $p = 0,24$).^{43, 44}

Es zeigte sich, dass der mittlere ADC postmortal in allen untersuchten Hirnregionen signifikant niedriger war als in vivo. Durch die unterschiedliche Reihenfolge der Diffusionskoeffizienten in den Regionen (ex vivo: Kleinhirn > Thalamus > Cerebrum, in vivo: Thalamus > Cerebrum > Kleinhirn) kann erklärt werden, warum sich der Ex-vivo-ADC im Cerebellum nicht signifikant von dem entsprechenden In-vivo-Wert von Helenius et al. unterscheidet. Darüber hinaus unterschieden sich die ADC-Werte der drei Hirnregionen untereinander postmortal stärker als in vivo. Der Ex-vivo-ADC des Kleinhirns $((46,1 \pm 10,9) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s})$ war 80,1 % höher als der des Großhirns $((25,6 \pm 12,2) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s})$. Intravital war der Unterschied zwischen diesen Regionen deutlich geringer (Naganawa: 6,9 %; Helenius: 16,9 %). Hierfür kann eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Regionen für Ischämie verantwortlich sein.

Die ADC-Werte der weißen Substanz steigen mit zunehmendem Alter, da aufgrund des Verlustes von Neuronen und Pericyten sowie der Veränderung von Kapillarwänden der extrazelluläre Raum größer wird. Deshalb waren die erhobenen Diffusionskoeffizienten der Stichgruppe (mittleres Alter: 71 Jahre) im Vergleich zu jüngeren Verstorbenen relativ höher. Geschlechtsunterschiede spielen bei einem Alter von über 60 Jahren keine Rolle, weshalb es nicht erforderlich war, ein Matching zwischen männlichen und weiblichen Verstorbenen vorzunehmen.⁴³

Weiterhin gab es einige erwähnenswerte Limitationen. Da die Wasserdiffusion von der Temperatur abhängig ist⁴⁵ und die Körpertemperatur der Leichen im Verlauf der Messung kontinuierlich sank (von $31,6 \pm 3,3 \text{ °C}$ auf $27,9 \pm 2,2 \text{ °C}$), ist ein Teil der ADC-Reduktion sicherlich darauf zurückzuführen. Der Winkel des Kopfes beeinflusst den ADC, jedoch war es infolge der Leichenstarre nicht immer möglich, den Kopf der Leichen exakt zu platzieren.⁴⁶ Des Weiteren kann der ADC aufgrund unbekannter Grunderkrankungen variieren (Neurofibromatose 1, HIV), obwohl die Gehirne in T1- und T2-gewichteten Bildern scheinbar gesund sind.^{47, 48}

Vorteile der Ex-vivo-Diffusionsbildgebung sind, dass es zu weniger Bewegungsartefakten kommt und dass längere Akquirierungszeiten möglich sind und somit langsamere DW-Spin-Echo-Sequenzen verwendet werden können, die den Vorteil geringerer Bildverzerrung bieten.^{49, 50}

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ex-vivo- und In-vivo-ADC-Werte im Gehirn signifikant voneinander unterscheiden und dass postmortal charakteristische Veränderungen der Wasserdiffusion auftraten. Diese ähneln den Veränderungen beim Schlaganfall und lassen sich durch gleiche zelluläre Phänomene erklären. Besonders gut ließ sich dieser Verlauf im Thalamus darstellen. Hier fiel der ADC von 2 h p.m. bis 19 h p.m. um 55 % ab.

Um den postmortalen Verlauf des scheinbaren Diffusionskoeffizienten noch besser zu verstehen, muss vor allem das frühpostmortale Intervall (< 4 h), aber auch der Zeitraum nach 20 Stunden genau untersucht werden. Außerdem muss die Reproduzierbarkeit der Daten weiter geprüft werden. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, kann die Ex-vivo-DWI des Gehirns ein nützliches Verfahren für die forensische Medizin sein.

5.2 ³¹P-Magnetresonanzspektroskopie der Oberschenkelmuskulatur

Die ³¹P-Magnetresonanzspektroskopie ist weitgehend anerkannt als Goldstandard zur nichtinvasiven Messung zahlreicher Stoffwechselmetaboliten im arbeitenden und ruhenden Muskel.⁵¹ Mit diesem Verfahren können in vivo phosphorhaltige Verbindungen quantifiziert werden. Dies wird unter anderem bei der Diagnostik und Therapiekontrolle der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und bei sportmedizinischen Untersuchungen genutzt.⁵²⁻⁵⁴ Bis jetzt gibt es allerdings nur wenige MRS-Untersuchungen über postmortale Metabolitveränderungen, diese wurden vor allem an Tieren durchgeführt.⁵⁵

Die Glykolyse spielt die Schlüsselrolle im Energiestoffwechsel der Skelettmuskulatur, indem Glucose zu Pyruvat umgewandelt wird, um ATP zu generieren.^{56, 57} Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat dann unter Bildung von H₂O und CO₂ oxidiert. Unter anaeroben Bedingungen, zum Beispiel zu Beginn der Muskelarbeit oder kurz nach dem Kreislaufstillstand, wird Pyruvat zu Laktat abgebaut, wodurch eine Gewebsazidose durch Ansammlung von Protonen entsteht.⁵⁸ Zusätzlich wird ATP

aus Kreatinphosphat durch die Kreatinkinase-Reaktion regeneriert, dies ist auch unmittelbar nach dem Tod der Fall.⁵⁹⁻⁶¹

Mit Eintreten des Todes erfolgt keine weitere Sauerstoffversorgung der Muskulatur. ATP wird jedoch weiterhin produziert, zuerst durch Kreatinphosphat und später aus Glykogen durch anaerobe Glykolyse.⁶² Somit sinkt nach Eintritt des Kreislaufstillstands die Kreatinphosphatkonzentration und gegenläufig steigt die Konzentration anorganischen Phosphats (Pi). Unsere Ergebnisse stimmen mit dieser Tatsache überein, was durch die sinkende postmortale PCr/Pi-Ratio bestätigt wird.

In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass sich die Blutkonzentration von ATP in vivo und ex vivo unterscheidet und dass die ATP-Konzentration im Musculus gastrocnemius von Ratten postmortal sinkt.^{63, 64} Während des von uns untersuchten postmortalen Zeitraums scheinen die oben genannten Mechanismen der ATP-Synthese zusammengebrochen zu sein. Der charakteristische Pi-Anstieg wird durch die Hydrolyse von ATP hervorgerufen. In der Muskulatur ließen sich ex vivo höhere Konzentrationen an Pi, verglichen mit ATP, nachweisen, weshalb die α -ATP/Pi-Ratio vermindert war. Auch in vivo können verminderte α -ATP/Pi-Ratios vorkommen, zum Beispiel bei einer Ischämie der Muskulatur. Der zeitliche Verlauf der ATP-Konzentration post mortem wird von den Glykogen- und Kreatinphosphatkonzentrationen bei Todeseintritt beeinflusst.

ATP ist der Basismetabolit zur Ausübung der Muskelkontraktion und der Totenstarre.⁶⁵ Diese tritt ein, wenn die ATP-Konzentration unter 85 % des Ausgangswerts abgefallen ist.¹ Bei ATP-Werten unter 15 % des Ausgangswertes ist die Totenstarre nahezu komplett ausgebildet, da sich Aktin- und Myosinfilamente irreversibel verbinden.⁶⁶ Es lassen sich vier verschiedene Rigortypen unterscheiden, die durch die Energiereserve der Muskulatur bei Todeseintritt, durch die Todesursache und durch die Umgebungstemperatur beeinflusst werden.⁶⁷⁻⁶⁹ Im Gegensatz zur postmortalen Adenosindiphosphat (ADP)- und Adenosinmonophosphat (AMP)-Konzentration, korreliert die ATP-Konzentration mit dem Verlauf der Totenstarre.

Es werden verschiedene Metabolitverhältnisse genutzt (PCr/ATP-Ratio, ATP/Pi-Ratio), um den metabolischen Zustand eines Organs zu charakterisieren. Die von uns erhobene In-vivo-PCr/ β ATP-Ratio = $4,8 \pm 2,6$ und ist somit vergleichbar mit

Literaturwerten entsprechender Muskelgruppen (M. quadriceps femoris: $4,2 \pm 0,7$, $4,5 \pm 0,2$).^{70, 71}

Die Ex-vivo- β -ATP-Resonanz konnte nur bis 10 Stunden post mortem zuverlässig analysiert werden. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der β -ATP/Pi-Ratio und der α -ATP/Pi-Ratio, jedoch konnte diese über einen längeren postmortalen Zeitraum untersucht werden. In anderen Arbeiten wird dieser Peak nicht zur Quantifizierung herangezogen, da β ADP an seiner Entstehung beteiligt ist.⁷² Jedoch liegt die ADP-Konzentration im ruhenden Muskel lediglich im Mikromol-Bereich.

Der Pi-Peak verschob sich von $5,18 \pm 0,13$ ppm (in vivo) um etwa 1,0 ppm bzw. 1,5 ppm nach 5 bzw. 10 Stunden p. m. Diese Verschiebung wurde durch die Veränderung des pH-Werts hervorgerufen, welche wiederum durch zunehmende Gewebeazidose bedingt ist. Der PCr-Peak blieb unverändert, da er unabhängig vom pH-Wert ist.

Insbesondere die α -ATP/Pi-Ratio zeigte einen charakteristischen postmortalen Verlauf. Dieser korrelierte mit der Zeit post mortem ($r^2 = 0,92$, $p < 0,001$) und fiel exponentiell ab von 0,445 (4 h p.m.) auf 0,032 (24 h p.m.).

Aus der erhobenen mono-exponentiellen Funktion aus Schmidt T et al. 2014 (Abbildung 2), konnten wir die inverse Funktion für die Zeit post mortem ableiten,

$$\text{Zeit p. m.} = -\ln((\alpha\text{-ATP/Pi} - 0,02) / 2,19) / 0,42$$

und ebenso für das 95%-Konfidenzintervall (Abbildung 3, ebendort). Dies bedeutet, dass bei einer gemessenen α -ATP/Pi-Ratio von 1,0 die Todesdauer zwischen 1,4 und 2,5 h beträgt, während eine Ratio von nur 0.1 das 95% Intervall von 5,7 bis 12,8 h p. m. erhöht.

Es gibt einige Umstände, die bei der Betrachtung berücksichtigt werden müssen. Die α -ATP-Resonanz wird durch α -ADP beeinflusst, aber sie ist länger nachweisbar als andere Signale. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Werte zu erreichen, sollte die Spektroskopie immer an einer definierten Muskelgruppe erfolgen, da die postmortalen Veränderungen des ATP-Gehalts je nach Muskelgruppe variieren.⁷³

Darüber hinaus unterliegen die Metabolitkonzentrationen interindividuellen Schwankungen. Verantwortlich hierfür sind unter anderem die tagesrhythmischen Schwankungen des Insulin- und Glukosespiegels.⁵¹ Der Einfluss der Ernährung ist nicht vollständig geklärt.^{74, 75}

Die Todesursache und die Zeit des Sauerstoffmangels beeinflussen den postmortalen ATP-Abfall ebenfalls. Wir haben keine Unterteilung der Leichen nach der Todesursache vorgenommen. Außerdem beeinflusst die Konstitution einer Person, beispielsweise die Zusammensetzung der Muskelfasern, aber auch der BMI die Ergebnisse. Trotz einer Varianz von nur 5 – 10 % in der Zusammensetzung der Skelettmuskelfasern zwischen verschiedenen Personen und dem Fakt, dass bei Menschen die Skelettmuskelfasern ohnehin gemischt sind, sollte ein gewisser Einfluss der Muskelfaserzusammensetzung aufgrund der unterschiedlichen metabolischen Eigenschaften von Typ II und Typ I Fasern beachtet werden. Schnell kontrahierende Muskelfasern (Typ II) zeigen höhere PCr/ATP- sowie PCr/Pi-Ratios und scheinen resistenter gegenüber Laktatazidose zu sein.⁷⁶ Wie wir zeigen konnten wird die in vivo α -ATP/Pi-Ratio negativ vom BMI der Patienten beeinflusst (lineare Regression: $r^2 = 0,9994$). Der BMI beeinflusst auch die Ex-vivo- α -ATP/Pi-Ratio. Eine lineare bi-variate Regression resultiert in einem negativen Regressionskoeffizienten für die Zeit p. m. ($-0,036 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$) und den BMI ($-0,005 \pm 0,006 \text{ m}^2/\text{kg}$) ($r = 0,56$, $p = 0,034$). Der Abbau von ATP wird auch durch die Temperatur beeinflusst. Die mittlere Körpertemperatur der Leichen sank während der Untersuchungen von 36 °C auf 25,7 °C. Die niedrigere Körpertemperatur führte auch zu verminderter Enzymaktivität und verlangsamtem ATP-Abbau.⁶³ Jedoch werden die Körperkerntemperatur und die Temperatur im Bereich des Oberschenkels variieren.

Limitiert wird die Studie durch die geringe Anzahl der untersuchten Leichen (DWI: $n = 21$, MRS: $n = 8$) und die Inhomogenität der Stichgruppe. Die Verstorbenen waren hinsichtlich ihres Alters, ihres Körpergewichts und ihrer Konstitution sehr verschieden. Aufgrund des hohen Alters kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine gesunde Stichgruppe vorlag. Es lagen keine Informationen über Grunderkrankungen und Todesursache der Verstorbenen vor, jedoch beeinflussen auch diese die untersuchten Parameter.

Aus logistischen Gründen, wie langen Transportzeiten und eingeschränkten Nutzungszeiten des MRT, aber auch aufgrund des niedrigen Aufkommens geeigneter Leichen, konnten nur wenige Messungen im frühen postmortalen Intervall (< 4 Stunden p.m.) durchgeführt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass in diesem Zeitraum beträchtliche Veränderungen der erfassten Parameter stattfanden, die somit nicht untersucht werden konnten.

Es sollten auch Messungen über den in dieser Studie untersuchten Zeitraum hinaus (> 23 h p.m.) durchgeführt werden, um beispielsweise die Rolle der Pseudonormalisierung des ADC im postmortalen Gehirn untersuchen zu können.

Die erhobenen Parameter wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch durch das kontinuierliche Absinken der Körperkerntemperatur der Leichen während des Untersuchungszeitraumes beeinflusst.

Da es bisher kaum Arbeiten im Bereich der postmortalen Diffusionsbildgebung und Magnetresonanztomographie gibt, liegen zu der in dieser Studie untersuchten Fragestellung nur sehr wenige Daten vor. Dies macht einen Vergleich beziehungsweise Rückschlüsse auf die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwierig.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob sich bisherige Methoden zur Todeszeitbestimmung mithilfe der MRT ergänzen lassen und ob sich In-vivo- und Ex-vivo-Messwerte signifikant voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ex-vivo-ADC-Werte des Gehirns signifikant von In-vivo-Werten unterscheiden und dass sich ein charakteristischer postmortaler Verlauf des ADC im Gehirn gezeigt hat. Mit der Kenntnis dieser Ergebnisse könnte die postmortale DWI des Gehirns eine Ergänzung zur virtuellen Autopsie (Virtopsy) darstellen. Zum Beispiel können Temperatureffekte die erhobenen Werte beeinflussen. Durch diese Veränderungen des ADC können Hinweise auf die Lagerung einer Leiche nach dem Tod gewonnen werden. Für eine zuverlässige Eingrenzung der Todeszeit ist das Verfahren jedoch nicht geeignet.

Vor allem die ermittelte α -ATP/Pi-Ratio zeigt einen signifikanten exponentiellen postmortalen Verlauf. Unter experimentellen Bedingungen erlaubt die inverse logarithmische Funktion dieser Ratio die Bestimmung der Todeszeit bis hin zu 8 h post mortem innerhalb eines 95 % Konfidenzintervalls. Deshalb könnte die ^{31}P -MRS ein effizientes Verfahren darstellen, um sowohl die virtuelle Autopsie als auch rechtsmedizinische Methoden zur Todeszeitbestimmung zu ergänzen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Henssge C, Madea B. Todeszeitbestimmung im frühpostmortalen Intervall. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin*. 1 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2004. 119-140.
- (2) Madea B, Krause D, Jachau K. Leichenerscheinungen und supravitale Reaktionen - Todeszeitbestimmung. In: Madea B, editor. *Praxis Rechtsmedizin*. 2. ed. Heidelberg: Springer; 2007. 32-52.
- (3) Vain A, Kauppila R, Vuori E. Estimation of the breaking of rigor mortis by myotonometry. *Forensic Sci Int* 1996;79(2):155-161.
- (4) Kobayashi M, Ikegaya H, Takase I, Hatanaka K, Sakurada K, Iwase H. Development of rigor mortis is not affected by muscle volume. *Forensic Sci Int* 2001;117(3):213-219.
- (5) Varetto L, Curto O. Long persistence of rigor mortis at constant low temperature. *Forensic Sci Int* 2005;147(1):31-34.
- (6) Madea B, Krause D, Jachau K. Leichenerscheinungen und supravitale Reaktionen - Todeszeitbestimmung. In: Madea B, editor. *Praxis Rechtsmedizin*. 2. ed. Heidelberg: Springer; 2007. 36-38.
- (7) Gaedke J. Bundeseinheitlicher Leichenschauschein. *Bestattungsgewerbe* 1968;20:59-61.
- (8) Schneider V, Wegener H.H. Fehler bei der ärztlichen Leichenschau. *Berliner Ärztekammer* 1985;22:490-494.
- (9) Eisenmenger W, Spann W, Liebhardt E. [Funeral laws and post-mortem examination--critical inventory]. *Beitr Gerichtl Med* 1982;40:49-53.
- (10) Schneider V, Rothschild MA. Leichenschauwesen in Deutschland. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004. 32.
- (11) Spann W. Der Ermittler als Anwalt des Verstorbenen. *Kriminalistik* 1987;41:586-608.

- (12) Klein A. Sektionstechnik. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004. 56.
- (13) Hamperl H. *Leichenöffnung Befund und Diagnose*. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York: Springer; 1964.
- (14) Klein A. Sektionstechnik. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin*. 1 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2004. 59-60.
- (15) Brinkmann B, Du Chesne A, Vennemann B. [Recent data for frequency of autopsy in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127(15):791-795.
- (16) Brogdon BG. The scope of forensic radiology. *Clin Lab Med* 1998;18(2):203-240.
- (17) Farina J, Millana C, Fdez-Acenero MJ, Furio V, Aragoncillo P, Martin VG, Buencuerpo J. Ultrasonographic autopsy (echopsy): a new autopsy technique. *Virchows Arch* 2002;440(6):635-639.
- (18) Bratzke H, Schneider V, Dietz W. [Radiographic investigation during medico-legal autopsies (author's transl)]. *Rofo* 1982;136(4):463-472.
- (19) Clasen RA. Computerized tomography and neuropathologists: two viewpoints. *J Neuropathol Exp Neurol* 1982;41(4):387-388.
- (20) Schumacher M, Oehmichen M, König HG, Einighammer H. [Intravital and postmortal CT examinations in cerebral gunshot injuries]. *Rofo* 1983;139(1):58-62.
- (21) Ezawa H, Yoneyama R, Kandatsu S, Yoshikawa K, Tsujii H, Harigaya K. Introduction of autopsy imaging redefines the concept of autopsy: 37 cases of clinical experience. *Pathol Int* 2003;53(12):865-873.
- (22) Bisset R. Magnetic resonance imaging may be alternative to necropsy. *BMJ* 1998;317(7170):1450.
- (23) Amberg R, Forster B, Furmaier R. Identification by MRI. *Z Rechtsmed* 1989;102(2-3):185-189.

- (24) Ros PR, Li KC, Vo P, Baer H, Staab EV. Preautopsy magnetic resonance imaging: initial experience. *Magn Reson Imaging* 1990;8(3):303-308.
- (25) Thali MJ, Yen K, Schweitzer W, Vock P, Boesch C, Ozdoba C, Schroth G, Ith M, Sonnenschein M, Doernhoefer T, Scheurer E, Plattner T, Dirnhofer R. Virtopsy, a new imaging horizon in forensic pathology: virtual autopsy by postmortem multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI)--a feasibility study. *J Forensic Sci* 2003;48(2):386-403.
- (26) Thali MJ. Virtual autopsy in forensic science using MRI - initial experiences. In: Goyen M, editor. *Real Whole-Body MRI*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2006. 171-179.
- (27) Yen K, Vock P, Tiefenthaler B, Ranner G, Scheurer E, Thali MJ, Zwygart K, Sonnenschein M, Wiltgen M, Dirnhofer R. Virtopsy: forensic traumatology of the subcutaneous fatty tissue; multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI) as diagnostic tools. *J Forensic Sci* 2004;49(4):799-806.
- (28) Yen K, Thali MJ, Aghayev E, Jackowski C, Schweitzer W, Boesch C, Vock P, Dirnhofer R, Sonnenschein M. Strangulation signs: initial correlation of MRI, MSCT, and forensic neck findings. *J Magn Reson Imaging* 2005;22(4):501-510.
- (29) Penrose LS. Measurement of pleiotropic effects in phenylketonuria. *Ann Eugen* 1951;16(2):134-141.
- (30) Sorensen AG, Wu O, Copen WA, Davis TL, Gonzalez RG, Koroshetz WJ, Reese TG, Rosen BR, Wedeen VJ, Weisskoff RM. Human acute cerebral ischemia: detection of changes in water diffusion anisotropy by using MR imaging. *Radiology* 1999;212(3):785-792.
- (31) Tamura H, Kurihara N, Machida Y, Nishino A, Shimosegawa E. How does water diffusion in human white matter change following ischemic stroke? *Magn Reson Med Sci* 2009;8(3):121-134.

- (32) Srivastava AK, Mehrotra G, Bhargava SK, Agarwal S, Tripathi RP. Studies on the time course of apparent diffusion coefficient and signal intensities on T2- and diffusion-weighted MR Imaging in acute cerebral ischemic stroke. *J Med Phys* 2008;33(4):162-170.
- (33) Warach S, Gaa J, Siewert B, Wielopolski P, Edelman RR. Acute human stroke studied by whole brain echo planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1995;37(2):231-241.
- (34) Schlaug G, Siewert B, Benfield A, Edelman RR, Warach S. Time course of the apparent diffusion coefficient (ADC) abnormality in human stroke. *Neurology* 1997;49(1):113-119.
- (35) Pierpaoli C, Righini A, Linfante I, Tao-Cheng JH, Alger JR, Di CG. Histopathologic correlates of abnormal water diffusion in cerebral ischemia: diffusion-weighted MR imaging and light and electron microscopic study. *Radiology* 1993;189(2):439-448.
- (36) Helpert JA, Dereski MO, Knight RA, Ordidge RJ, Chopp M, Qing ZX. Histopathological correlations of nuclear magnetic resonance imaging parameters in experimental cerebral ischemia. *Magn Reson Imaging* 1993;11(2):241-246.
- (37) Sotak CH. The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain injury - a review. *NMR Biomed* 2002;15(7-8):561-569.
- (38) Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 1996;27(9):1641-1646.
- (39) Hoehn-Berlage M, Norris DG, Kohno K, Mies G, Leibfritz D, Hossmann KA. Evolution of regional changes in apparent diffusion coefficient during focal ischemia of rat brain: the relationship of quantitative diffusion NMR imaging to reduction in cerebral blood flow and metabolic disturbances. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(6):1002-1011.
- (40) Fiehler J, Fiebach JB, Gass A, Hoehn M, Kucinski T, Neumann-Haefelin T, Schellinger PD, Siebler M, Villringer A, Röther J. Diffusion-weighted imaging in

acute stroke--a tool of uncertain value? *Cerebrovasc Dis* 2002;14(3-4):187-196.

- (41) Tarui T, Khwaja OS, Estroff JA, Robinson JN, Grant PE. Fetal MR Imaging Evidence of Prolonged Apparent Diffusion Coefficient Decrease in Fetal Death. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010.
- (42) Krause D. Leichenerscheinungen und Todeszeitbestimmung. In: Brinkmann B, Madea B, editors. *Handbuch gerichtliche Medizin*. 1 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2004. 150.
- (43) Naganawa S, Sato K, Katagiri T, Mimura T, Ishigaki T. Regional ADC values of the normal brain: differences due to age, gender, and laterality. *Eur Radiol* 2003;13(1):6-11.
- (44) Helenius J, Soinne L, Perkio J, Salonen O, Kangasmaki A, Kaste M, Carano RA, Aronen HJ, Tatlisumak T. Diffusion-weighted MR imaging in normal human brains in various age groups. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23(2):194-199.
- (45) Le Bihan D, Delannoy J, Levin RL. Temperature mapping with MR imaging of molecular diffusion: application to hyperthermia. *Radiology* 1989;171(3):853-857.
- (46) Ulug AM, van Zijl PC. Orientation-independent diffusion imaging without tensor diagonalization: anisotropy definitions based on physical attributes of the diffusion ellipsoid. *J Magn Reson Imaging* 1999;9(6):804-813.
- (47) Eastwood JD, Fiorella DJ, MacFall JF, Delong DM, Provenzale JM, Greenwood RS. Increased brain apparent diffusion coefficient in children with neurofibromatosis type 1. *Radiology* 2001;219(2):354-358.
- (48) Filippi CG, Ulug AM, Ryan E, Ferrando SJ, van GW. Diffusion tensor imaging of patients with HIV and normal-appearing white matter on MR images of the brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22(2):277-283.
- (49) Skare S, Andersson JL. On the effects of gating in diffusion imaging of the brain using single shot EPI. *Magn Reson Imaging* 2001;19(8):1125-1128.

- (50) Dyrby TB, Baare WF, Alexander DC, Jelsing J, Garde E, Sogaard LV. An ex vivo imaging pipeline for producing high-quality and high-resolution diffusion-weighted imaging datasets. *Hum Brain Mapp* 2010.
- (51) Layec G, Bringard A, Le Fur Y, Vilmen C, Micallef JP, Perrey S, Cozzzone PJ, Bendahan D. Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A ³¹P-MRS study. *Magn Reson Med* 2009;62(4):840-854.
- (52) Isbell DC, Berr SS, Toledano AY, Epstein FH, Meyer CH, Rogers WJ, Harthun NL, Hagspiel KD, Weltman A, Kramer CM. Delayed calf muscle phosphocreatine recovery after exercise identifies peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(11):2289-2295.
- (53) Chance B, Im J, Nioka S, Kushmerick M. Skeletal muscle energetics with PNMR: personal views and historic perspectives. *NMR Biomed* 2006;19(7):904-926.
- (54) Schunk K, Romaneehsen B, Rieker O, Düber C, Kersjes W, Schadmand-Fischer S, Schmiedt W, Thelen M. Dynamic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in arterial occlusive disease: effects of vascular therapy on spectroscopic results. *Invest Radiol* 1998;33(6):329-335.
- (55) Hirakawa K, Koike K, Uekusa K, Nihira M, Yuta K, Ohno Y. Experimental estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR metabolic data. *Legal Medicine*:2009;11:S282-S285.
- (56) Greiner A, Esterhammer R, Pilav S, Arnold W, Santner W, Neuhauser B, Fraedrich G, Jaschke WR, Schocke MF. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle during moderate isotonic exercise under different degrees of cuff compression: a phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy study. *J Vasc Surg* 2005;42(2):259-267.
- (57) Laaksonen MS, Kalliokoski KK, Kyrolainen H, Kemppainen J, Teras M, Sipila H, Nuutila P, Knuuti J. Skeletal muscle blood flow and flow heterogeneity during dynamic and isometric exercise in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(3):H979-H986.

- (58) Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(3):R502-R516.
- (59) Henckel P, Karlsson A, Jensen MT, Oksbjerg N, Petersen JS. Metabolic conditions in porcine longissimus muscle immediately pre-slaughter and its influence on peri- and post mortem energy metabolism. *Meat Sci.* 2002 Oct;62(2):145-55.
- (60) Lametsch R, Roepstorff P, Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem.* 2002 Sep 25;50(20):5508-12.
- (61) Jia X, Ekman M, Grove H, Faergestad EM, Aass L, Hildrum KI, Hollung K. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J Proteome Res.* 2007 Jul;6(7):2720-31.
- (62) Needham D. *Machina carnis: The biochemistry of muscular contraction in its historical development*. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- (63) Sugie H, Nishikawa T, Funao T. Quantitation of nucleotides, nucleosides and bases in antemortem and postmortem bloodstains by high-performance liquid chromatography. *Forensic Sci Int* 1995;71(2):123-130.
- (64) Huang H, Yan Y, Zuo Z, Yang L, Li B, Song Y, Liao L. Determination of adenosine phosphates in rat gastrocnemius at various postmortem intervals using high performance liquid chromatography. *J Forensic Sci* 2010;55(5):1362-1366.
- (65) DiMaio DJ, DiMaio VJM. *Forensic pathology*. 2nd ed. New York: CRC; 2001.
- (66) Bate-Smith EC, Bendall JR. Factors determining the time course of rigor mortis. *J Physiol* 1949;110(1-2):47-65.
- (67) Krompecher T, Fryc O. Experimental evaluation of rigor mortis. IV. Change in strength and evolution of rigor mortis in the case of physical exercise preceding death. *Forensic Sci Int* 1978;12(2):103-107.

- (68) Krompecher T, Bergerioux C, Brandt-Casadevall C, Gujer HR. Experimental evaluation of rigor mortis. VI. Effect of various causes of death on the evolution of rigor mortis. *Forensic Sci Int* 1983;22(1):1-9.
- (69) Krompecher T. Experimental evaluation of rigor mortis. V. Effect of various temperatures on the evolution of rigor mortis. *Forensic Sci Int* 1981;17(1):19-26.
- (70) McCully KK, Turner TN, Langley J, Zhao Q. The reproducibility of measurements of intramuscular magnesium concentrations and muscle oxidative capacity using ³¹P MRS. *Dyn Med* 2009;8:5.
- (71) Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed* 2007;20(6):555-565.
- (72) Hoffenberg EF, Kozlowski P, Salerno TA, Deslauriers R. Evaluation of cardiac ³¹P magnetic resonance spectroscopy: reviewing NMR principles. *J Surg Res* 1996;62(1):135-143.
- (73) Kobayashi M, Takatori T, Iwadate K, Nakajima M. Reconsideration of the sequence of rigor mortis through postmortem changes in adenosine nucleotides and lactic acid in different rat muscles. *Forensic Sci Int* 1996;82(3):243-253.
- (74) Miller RG, Carson PJ, Moussavi RS, Green A, Baker A, Boska MD, Weiner MW. Factors which influence alterations of phosphates and pH in exercising human skeletal muscle: measurement error, reproducibility, and effects of fasting, carbohydrate loading, and metabolic acidosis. *Muscle Nerve* 1995;18(1):60-67.
- (75) Lunt JA, Allen PS, Brauer M, Swinamer D, Treiber EO, Belcastro A, Eccles R, King EG. et al. An evaluation of the effect of fasting on the exercise-induced changes in pH and Pi/PCr from skeletal muscle. *Magn Reson Med* 1986;3(6):946-952.

- (76) Kushmerick MJ, Moerland TS, Wiseman RW. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7521-7525.

8. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die beiden in dieser Doktorarbeit enthaltenen Publikationen wurden in dem Journal „Forensic Science International“ veröffentlicht und sind in dem Internetportal „Pubmed“ gelistet.

Der von mir zu dieser Promotion beigetragene Eigenanteil wird im Folgenden dargelegt.

Idee und Konzept der Studie:

Wurde von PD Dr. med. Jin Yamamura entworfen.

Datenerhebung:

Nach der Erstellung des Entwurfs stand primär die Datenerhebung im Vordergrund, welche ich nach Einweisung an dem Gerät selbständig durchgeführt habe.

Datenauswertung und Statistik:

Bei der Erstellung und Auswertung der Daten konnte ich durch die Expertise von Dr. Roland Fischer das Erstellen und Auswerten von statistisch sinnvollen Tabellen erlernen. Dabei wurde das Programm Microsoft Excel zur genauen Übersichtsdarstellung verwendet.

Interpretation und kritische Beurteilung der Daten:

Die Interpretation der Daten erfolgte einerseits durch kritische Literaturrecherche und durch konstruktive Diskussionen mit Dr. Fischer und PD Dr. Yamamura.

Manuskripte:

Ich habe große Teile der Manuskripte verfasst, welche genau wie diese Promotion, kritisch durch meine Betreuer geprüft wurden.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Dr. Roland Fischer für die enorme Geduld sowie fortwährende Motivation und konstruktive Kritik bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Zhiyue Jerry Wang (Dallas) für die wichtige Hilfe bei der Analyse der ^{31}P -Spektren.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Jin Yamamura für viele hilfreiche Ideen und Denkanstöße bedanken.

Außerdem gilt meine Dank Dr. Axel Heinemann für die enge Kooperation im Bereich der Rechtsmedizin.

10. Lebenslauf

Name: Tony Manfred Schmidt

Geburtsdatum/ -ort: 05.07.1986 in Rostock

Eltern: Dr. med. Harald Schmidt, Arzt
Katrín Krüger, Lehrerin

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1993 bis 1997 Grundschole 4, Rostock

1997 bis 2003 Wilhelm-von-Humboldt-Gymnasium, Rostock

2003 bis 2006 Ernst-Barlach-Gymnasium, Rostock, Abschluss: Abitur (1,6)

Studium

Oktober 2006 bis Universität Hamburg

August 2011 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Humanmedizin

September 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note -gut-

August 2011 bis Universität Rostock

November 2012 Humanmedizin

November 2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note –sehr gut-

Berufliche Ausbildung

Seit Januar 2013 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und
Unfallchirurgie
Klinikum Südstadt Rostock

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: