

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. W. LAVES).

## Diaminoxydasebestimmung bei Spurenuntersuchungen.

Von

STEFFEN P. BERG,

Assistent am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 6. August 1947.)

Methoden der Fermentforschung wurden bisher erst in beschränktem Maße für die Aufgaben der forensischen Spurenuntersuchung herangezogen. So benutzte B. MUELLER\* den Nachweis der Speichelamylase zur Erkennung von Speichelklecksen; SCHWARZ\*\* zeigte, daß durch quantitative Bestimmung der Katalase und Peroxydase in geeigneten Fällen das Alter von Blutspuren ermittelt werden kann. Im Folgenden soll nun über Erfahrungen mit der Bestimmung eines weiteren Fermentes in Spuren berichtet werden.

Im Verlaufe von Untersuchungen über das postmortale Verhalten der Diaminoxydase (Diaminoxydase = Histaminase) fanden sich in der einschlägigen Literatur Hinweise, welche die Bestimmung dieses Fermentes zur Verfeinerung des Spurenachweises in geeigneten Fällen aussichtsreich erscheinen ließen. Zunächst ergab sich die Notwendigkeit, durch Vorversuche die Spezifität des Vorkommens sowie die Haltbarkeit und Nachweisbarkeit der Diaminoxydase in Spuren zu prüfen und eine geeignete Nachweismethode herauszufinden. Dazu lieferte das Schrifttum bereits zahlreiche Anhaltspunkte. Es erscheint daher angebracht, zunächst in gedrängter Form über die Ergebnisse der bisherigen Forschungen zur Kenntnis der Diaminoxydase zu berichten.

Im Jahre 1929 entdeckte BEST<sup>1</sup> im Anschluß an DALES Untersuchungen über den Histamingehalt von Organen<sup>2</sup> ein Histamin abbauendes Ferment, das er Histaminase nannte.

Die *Substratspezifität* dieses Enzyms wurde mehrfach nachgeprüft; dabei stellte ZELLER<sup>3</sup> fest, daß außer Histamin noch verschiedene andere Diamine, wie Putrescin, Cadaverin, Agmatin durch Histaminase abgebaut werden. ZELLER schlug deshalb für dieses Ferment, entsprechend der Monaminoxydase von RICHTER, PUGH und QUARTEL<sup>4</sup>, die Bezeichnung Diaminoxydase vor. Bei späteren Untersuchungen fand er jedoch, daß nicht nur Diamine, sondern auch

\* MUELLER, B.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 11, 211 (1928).

\*\* SCHWARZ: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 27, 1 (1937).

Tri- und Tetraamine, wie Spermidin und Spermin, zu den Substraten der Diaminoxydase gehören, welche demnach auch als Polyaminoxydase bezeichnet werden könnte.

*Bau der Diaminoxydase.* Wie viele Fermente besteht vermutlich auch die Diaminoxydase aus einer prosthetischen Gruppe und einem Trägerprotein, welches sich durch Einwirkung von Trypsin und Papain zerstören lässt; dabei verliert das Ferment seine Aktivität. Nach Untersuchungen von ZELLER<sup>5, 6, 7</sup> scheint es sich bei der Wirkgruppe des Fermentes um ein Flavin zu handeln, welches an entscheidender Stelle eine Carbonylgruppe, vermutlich von Aldehydnatur enthält.

Der *Reaktionsmechanismus* der Diamin-Diaminoxydasereaktion ergab sich auf Grund der Arbeiten von BEST<sup>1, 8</sup>, McHENRY und GAVIN<sup>9</sup> sowie ZELLER<sup>8, 5, 10</sup>. Der Abbau der verschiedenen Substrate durch das Ferment verläuft unter Aufnahme von Sauerstoff und Wasser, Abspaltung von Ammoniak und Bildung von Hydroperoxyd. Die Diamin-Diaminoxydasereaktion stellt also eine oxydative Desaminierung dar; die Diaminoxydase ist wie die Aminosäureoxydase und die Monoaminoxydase den Oxhydrasen zuzuordnen. Durch die Wirkung der Diaminoxydase werden die abgebauten Diamine biologisch inaktiv, es entstehen Aminoaldehyde, welche ihrerseits wahrscheinlich durch Xanthinoxydase zu Aminosäuren, diese durch Monaminoxydase wieder zu Aldehyden weiter abgebaut werden<sup>6</sup>.

Über die *Eigenschaften* der Diaminoxydase geben die Arbeiten von BEST<sup>1, 8</sup>, EDLBACHER und ZELLER<sup>7</sup>, ZELLER<sup>8, 5, 6, 10</sup> und KIESE<sup>11</sup> Auskunft: Die optimale Reaktionstemperatur liegt zwischen 37 und 38°, das pH-Optimum zwischen 7,0 und 8,5. Die verschiedenen Substrate zeigen eine verschieden große Affinität gegenüber dem Ferment, auch ist die Desaminierungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substraten nicht die gleiche. Cadaverin wird z. B. schneller abgebaut als Histamin. Desaminierungsgeschwindigkeit und Affinität gehen aber nicht parallel. Ein Substrat mit größerer Affinität vermag ein anderes im Konkurrenzversuch durch völlige Blockierung des Fermentes vom Abbau auszuschalten. So wirken Spermin und Spermidin gegenüber den Diaminen als „competitive inhibitors“. Auf die Diamin-Diaminoxydasereaktion üben verschiedene Körper in charakteristischer Weise eine mehr oder weniger starke Hemmungswirkung aus (so z. B. Kaliumcyanid, Carbonylgruppenreagenzien usw.), welcher Umstand bei Fermentbestimmungen zur Identifizierung der Diaminoxydase verwendet werden kann. Die Diaminoxydase der tierischen Gewebe ist ein verhältnismäßig unempfindliches Lyo-enzym, das auf verschiedene Weise in haltbare Trockenpräparate übergeführt werden kann. Das Ferment kann durch Adsorption an Fuller- oder Bleicherde gebunden, dann aber nur schwer wieder eluiert werden<sup>8, 7</sup>. Durch Erwärmen auf 60° oder Einstellen des pH auf 3,0 wird die Diaminoxydase rasch zerstört.

Die *Bestimmungsmethoden* für die Diaminoxydase gründen sich auf den Mechanismus der Diamin-Diaminoxydasereaktion bzw. den Nachweis spezifischer Substratwirksamkeit. 1. Chemische Verfahren: Die bei der Diamin-Diaminoxydasereaktion verbrauchte Sauerstoffmenge, im WARBURG-Apparat manometrisch gemessen, bildet ein Maß für die vorhandene Diaminoxydasemenge<sup>5</sup>. Desgleichen kann die titrimetrisch oder nach Neßlerisierung des Destillates colorimetrisch bestimmte Ammoniakmenge aus der Diamin-Diaminoxydase-reaktion zur Bestimmung der Diaminoxydase benutzt werden<sup>7</sup>. ZELLER<sup>12</sup> gab weiterhin eine Diaminoxydasebestimmung mittels Entfärbung von Indigodisulfonat durch bei der Diamin-Diaminoxydasereaktion intermediär entstehendes Hydroperoxyd an. Schließlich kann nach Ablauf der Diamin-Diaminoxydase-

reaktion die Bestimmung des noch unveränderten Substratanteiles als Maß für die in Aktion getretene Fermentmenge dienen. So kann bei Verwendung von Histamin als Substrat dieses durch Bestimmung der NH<sub>2</sub>-Gruppe der Seitenkette nach VAN SLYKE ermittelt werden. 2. Biologische Verfahren: Die aus der Diamin-Diaminoxydasesreaktion restierende Histaminmenge wird auf Grund der pharmakologischen Wirkungen dieses Stoffes am Blutdruck der narkotisierten Katze (BEST und MC HENRY<sup>8</sup>) oder am isolierten atropinisierten Meerschweinchen-dünndarm (WERLE und HEREMANN<sup>13</sup>) gemessen.

Auch über das *Vorkommen* der Diaminoxydase liegen zahlreiche Untersuchungen vor. WERLE<sup>14</sup> fand teilweise beträchtliche Histaminabbauwerte durch Diaminoxydase von Bakterien (so z. B. Coli, Fluorescenz, Pyocyanum und Proteus, nicht dagegen Enteritis, Typhus usw.) und Pilzen; auch in Pflanzen wurde teilweise Diaminoxydase angetroffen. Von tierischen Geweben ergaben sich vor allem für Niere (besonders deren Rinde), Darmschleimhaut, Nebenniere, Pankreas und Placenta hohe Diaminoxydasesewerte<sup>6, 15, 16, 17, 18</sup>. Von den Körperflüssigkeiten zeigt das Blut einen niedrigen Diaminoxydasespiegel, welcher bei verschiedenen Krankheiten (Tuberkulose<sup>19</sup>, Vitiligo<sup>20</sup>, allergische Erkrankungen<sup>19, 21</sup>, Diphtherie und Scharlach<sup>16</sup>) erniedrigt, während der Schwangerschaft<sup>22, 23, 24, 25, 26</sup> bedeutend erhöht ist. Die letztere Tatsache wurde von WERLE und EFFKEMANN<sup>26</sup> sowie ZELLER und BIRKHÄUSER<sup>25</sup> bei der Ausarbeitung von Methoden zum Schwangerschaftsnachweis benutzt. Im Harn ist die Diaminoxydase während der Gravidität nicht vermehrt (WERLE<sup>27</sup>). Im Sperma wurde von ZELLER<sup>28</sup> ein Diaminoxydasegehalt gefunden, welcher die Werte des Normalserums um etwa das 100fache übertrifft.

Über die *Bedeutung* der Diaminoxydase und ihres Vorkommens im Zusammenhang mit den vielseitigen patho-physiologischen Wirkungen ihrer Substrate, besonders des Histamins, und ihre Anwendung in der Therapie liegt gleichfalls eine Fülle interessanter Mitteilungen vor, welche aber in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt werden können. Es sei schließlich noch angeführt, daß man mit Hilfe bekannter Diaminoxydasmengen quantitative Histaminbestimmungen durchführen kann, wie W. LAVES<sup>28a</sup> mit Hilfe der WARBURG-Technik nachgewiesen hat.

Bei der Auswahl eines für meine Zwecke geeigneten Diaminoxydase-nachweisverfahrens war einmal zu berücksichtigen, daß es möglichst einfach durchführbar sein sollte, damit seine Anwendung in der forensischen Praxis nicht von vornherein illusorisch erschiene. Andererseits sollte die Methodik eine ausreichende Meßgenauigkeit innerhalb geringer Konzentrationen bieten, weil bei der Untersuchung von Fleckenmaterial nur kleinere Werte erwartet werden konnten.

Infolge ihrer Einfachheit schien zunächst die indigometrische Bestimmung der Diaminoxydase nach ZELLER<sup>12</sup> bestechend. In ausgedehnten Vorversuchen wurde deshalb diese Methode nach den erwähnten Gesichtspunkten geprüft. Hierbei konnte die Erfahrung ZELLERS, daß der Farbstoff unter den angegebenen Bedingungen beim Ablauf der Diamin-Diaminoxydasesreaktion in der Zeiteinheit zunehmend entfärbt wird, im wesentlichen bestätigt werden. Ansätze von 1 ccm der dialysierten Spermalösung mit 0,1 ccm einer 0,1-molaren Cadaverinlösung unter Zusatz von 0,1 ccm der Indigodisulfonatlösung

(20 mg in 30 ccm Phosphatpuffer vom  $p_{\text{H}}$  7,2) und primärem Oktylalkohol, bei  $38^{\circ}$  nach 15 Min.  $\text{O}_2$ -Durchleitung inkubiert, zeigten innerhalb von 24 Stunden eine fast völlige Entfärbung. Durch Zusatz von Kaliumcyanid bzw. Semicarbazid in 0,00004-molarer Lösung ließ sich die Entfärbung verhindern. Vergleichsansätze mit Torantil (Bayer) zeigten nach 12—18 Stunden völlige Entfärbung. ZELLER<sup>10, 12</sup> erklärt die Entfärbung von Indigodisulfonat durch die Diamin-Diaminoxydasereaktion derart, daß bei der Reaktion intermedial entstandenes Hydroperoxyd den Farbstoff sekundär oxydiere und damit entfärbte; die Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Autooxydation eines Dihydroflavins wies er durch Sekundäroxydation von Hämoglobin und Äthylalkohol nach, wobei die Übertragung des Sauerstoffs auf den zu oxydierenden Körper mit Hilfe einer peroxydatisch wirksamen Substanz (Katalase) geschehe<sup>29</sup>. Die Reaktion spielt sich in einem Potentialbereich von + 115 bis — 34 Millivolt ab. — Diesem Gedankengang konnte ich auf Grund meiner Versuche nicht ganz folgen. Indigodisulfonat läßt sich durch Reduktion, nicht aber durch Oxydation entfärbten. Im Falle der Diamin-Diaminoxydasereaktion könnte nach WERLE Indigodisulfonat durch Aufnahme des Substratwasserstoffs, der durch die Diaminoxydase gelockert wurde, entfärbt werden. Entweder übernimmt das Disulfonat den Wasserstoff direkt, oder — an Stelle von Sauerstoff — vom reduzierten Flavin. Dabei entsteht aber kein Hydroperoxyd. Übrigens kann man Indigodisulfonat auch durch Alkalisierung entfärbten; dieses Moment ( $\text{NH}_3$ -Bildung) kommt aber unter den Versuchsbedingungen nicht zur Auswirkung, weil das Milieu ausreichend gepuffert ist. Entfärbtes Indigodisulfonat gewinnt durch Luftoxydation oder Zusatz von Hydroperoxyd seine Farbe zurück (vgl. Indigo als Küpenfarbstoff). Über die Beeinflussung von Äthylalkohol und Hämoglobin durch die Diamin-Diaminoxydasereaktion fehlen mir eigene Erfahrungen. Trotz der gut reproduzierbaren Beeinflussung des genannten Redoxindicators durch die Diamin-Diaminoxydasereaktion erschien mir aber die indigometrische Methode zum Nachweis kleiner Diaminoxydasemengen nicht besonders geeignet. Wie Versuche mit verschiedenen Körperflüssigkeiten zeigten, wurde Indigodisulfonat auch durch Inkubation mit Sekretansätzen entfärbt, welche Diaminoxydase sicher nicht enthielten (Kontrollen der gleichen Ansätze mittels anderer Verfahren zeigten keinen Abbau von Histamin); andererseits gestaltete sich die stufenphotometrische Verfolgung der Entfärbung, wie sie für Ansätze mit geringen Fermentmengen notwendig ist, einigermaßen problematisch, wenn es sich um trübe oder gefärbte Extrakte handelte (Blutflecken); die von ZELLER für solche Fälle angegebene Enteiweißung mit Trichloressigsäure nach Abschluß der Reaktion erwies sich als unbrauchbar, weil durch die Fällung immer ein erheblicher Prozentsatz des Farbstoffes mitgerissen wurde.

Spezifisch für das Vorhandensein von Diaminoxydase ist sicher der Nachweis des Abbaues ihrer Substrate. Bei der Wahl zwischen den rein chemischen Methoden zur Bestimmung z. B. des Histaminabbaues und einem biologischen Verfahren ist die Erfahrung ausschlaggebend, daß die ersten sicher größere Fehlerquellen bergen, weswegen kleinste Differenzen mit ihrer Hilfe schlechter erfassbar sind. Nach weiteren Versuchen mit der Bestimmung kleinster Histaminmengen am isolierten, atropinisierten Meerschweinchendünndarm, schien mir schließlich das von WERLE und EFFKEMANN<sup>23, 26</sup> angegebene Verfahren für die Diaminoxydasebestimmung in Sekret- und Blutflecken am besten geeignet.

Mit diesem Verfahren sollte versucht werden, analog zu den unter günstigen physiologischen Verhältnissen gewonnenen Befunden Spermaflecken und Blutspuren bestimmter Herkunft durch Diaminoxydasebestimmungen zu erkennen und von anderen Spuren zu unterscheiden.

#### Nachweis von Spermaflecken durch Diaminoxydasebestimmung.

Nach ZELLER<sup>28</sup> ist im menschlichen Sperma eine Diaminoxydaseaktivität nachweisbar, welche diejenige des Blutserums um das etwa 100fache übertrifft. In verschiedenen Versuchen mit Frischsperma konnten die Angaben ZELLERS bestätigt werden: 1 ccm Sperma bewirkte in Ansätzen mit 200 γ Histamin einen durchschnittlichen Abbau von 120 γ. Versuche mit Ejakulaten von Personen mit Oligo-, Nekro- und Azoospermie zeigten, daß die Diaminoxydase in diesen Fällen ebenso vorhanden und aktiv ist wie im Normalsperma. Diese Befunde stimmen mit den von ZELLER mit der manometrischen bzw. indikometrischen Methode gewonnenen Ergebnissen gut überein. Die Diaminoxydaseaktivität von Sperma, welches einige Zeit in vitro aufbewahrt wurde, nahm rasch ab. Bei Stehenlassen des Ejakulates bei Zimmertemperatur war nach 1—3 Tagen Diaminoxydase kaum mehr nachweisbar; die Aufbewahrung im Eisschrank verzögerte die Zerstörung des Fermentes, verhinderte sie aber nicht. Eine Erklärung für das Verschwinden der Diaminoxydase beim Stehenlassen von Lösungen kann deshalb nicht nur in einem langsamem Verbrauch des Fermentes durch Reaktion mit seinen natürlichen Substraten (in diesem Fall Spermin, Spermidin) gefunden werden, sondern ist vielleicht auch in einer Zerstörung des Trägerproteins durch auch bei niedrigen Temperaturen wirksame Proteininasen zu suchen.

Weiterhin wurden von bekannten Spermamengen auf Filterpapier Flecken hergestellt. Zu verschiedenen Zeiten nach der Ein trocknung wurden die Flecken zerschnitten und mit Phosphatpuffer vom  $p_H$  7,2 bzw. mit Tyrodelösung 1 Stunde extrahiert. Die Extrakte

Tabelle 1.

Art des Materials	Zur Extraktion verwendete Puffermenge	Ansatz mit Histamin ( $\gamma$ )	Reaktionszeit Min.	Abgebaute Histaminmenge ( $\gamma$ ) = Diaminoxydaseswert
Spermafleck aus 1 ccm, 8 Stunden alt	2	2	120	2
	2	12	120	12
	2	24	120	24
	2	48	120	46
	2	100	120	50
	2	200	120	60
Azoospermiefleck 1 Tag alt (1 ccm) . . .	2	100	120	48
Spermafleck aus 1 ccm, 7 Tage . . .	2	100	120	32
Spermafleck aus 0,7 ccm, 3 Wochen .	2	20	120	16

wurden mit 2—200  $\gamma$  Histamin versetzt, die Ansätze und Minuskontrollen während 90—120 Min. unter  $O_2$  bei 37,5° geschüttelt und dann die nicht abgebaute Histaminmenge am isolierten atropinierten Meerschweinchendünndarm bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Diaminoxydase des Spermias durch den Trocknungsprozeß nicht zerstört, sondern im Gegenteil ähnlich, wie es bei Acetontrockenpräparaten der Fall ist, konserviert wird. Immerhin ist in den Fleckenextrakten nurmehr etwa die Hälfte des Diaminoxydaseswertes aufzufinden, welcher der analogen Menge frischen Spermias entspricht, zumal wenn es sich um ältere Flecken handelt. Als Grund für diesen Fermentschwund ist wohl im wesentlichen die Sorption der verwendeten Unterlage und Verluste bei der Extraktion anzusehen.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, wurden von Extrakten aus Flecken von 1 ccm Sperma steigende Mengen Histamin bis zu 24  $\gamma$  vollständig, von 48  $\gamma$  noch 46  $\gamma$  abgebaut; der Diaminoxydaseswert eines 8 Stunden alten Fleckens aus 1 ccm Sperma beträgt also 46. Bei Verwendung des gleichen Materials wurden bei Beschickung der Ansätze mit 100 bzw. 200 Histamin wurden 50 bzw. 60  $\gamma$  abgebaut. Die abgebaute Histaminmenge ändert sich, wie WERLE und EFFKEMANN<sup>26</sup> für Schwan-gerenblut zeigten, je nach Dosierung des Histamins im Ansatz; bei Zusatz größerer Histamindosen baut die gleiche Fermentmenge mehr ab, jedoch nicht den gleichen Prozentsatz der Gesamtmenge wie bei kleinen Dosen (Eigenhemmung).

Auch in Ejakulatflecken bei Azoospermie ließ sich Diaminoxydase nachweisen.

Zusatz von Cyanid bzw. Semicarbazid, oder Erhitzen der Extrakte auf 60° bewirkte ein fast völliges Ausbleiben des Histaminabbaus.

Um zu untersuchen, ob sich mit Hilfe der Diaminoxydasebestimmung in Spermaflecken ein spezifischer Spermanachweis ausarbeiten

Tabelle 2.

Art des Materials	Ansatzmenge Histamin in $\gamma$	Abgebauta Histamin- menge in $\gamma$ = Diamin- oxydaseswert
Vaginalsekretfleck		
{ 1 Tag alt . . . . .	2	0,0
{ 1 Tag alt . . . . .	10	0,2
{ postmenstruell . . . . .	2	0,1
Fluor albus . . . . .	2	0,0
Trichomonadenfluor . . . . .	4	0,3
Vaginalsekret bei Gonokokken . . . . .	3	0,0
Bartholinisekret . . . . .	2	0,1
Absciseiter . . . . .	2	0,0
Cervicalsekret . . . . .	6	0,3
Desgl. bei Endometritis . . . . .	6	0,1
Trippereiter ♂ . . . . .	2	0,0
Speichel . . . . .	2	0,0
Harn . . . . .	2	0,0
Nasenschleim . . . . .	2	0,0
Auswurf . . . . .	2	0,1
Schweiß . . . . .	2	0,0
Serum ♂ . . . . .	10	0,5
Schwangerenvaginalsekret . . . . .	{ 2 5 20	{ 0,7 2,0 4,0
Muttermilch . . . . .	{ 3 2 20	{ 2,2 0,4 1,0
Colostrum . . . . .	{ 2 20 10	{ 1,1 3,6 0,5

ließe, mußten nun die verschiedensten Flecken organischer Herkunft auf etwaigen Diaminoxydasegehalt geprüft werden. Dabei wurden die zugesetzten Histaminmengen von vornherein wesentlich kleiner gehalten, da in den meisten Fällen keine oder eine nur geringe Diaminoxydaseaktivität zu erwarten war. Die zur Herstellung der Flecken verwendete, im einzelnen nicht genau bestimmbarer Sekretmenge (Tupferabstriche) lag schätzungsweise zwischen 0,3 und 2,0 ccm. Extraktionszeit: 1 Stunde; zur Extraktion verwendete Flüssigkeitsmenge: 2—4 ccm; Reaktionszeit: 120 Min. Das Material wurde durchweg frisch verarbeitet.

Diese Versuchsreihe (Tabelle 2) zeigte, daß die Ansätze mit Flecken von verschiedenen Sekreten Diaminoxydaseswerte von 0,0 bis höchstens 0,5 ergaben. Die untersuchten Sekrete schwangerer Frauen dagegen ließen gegenüber der Norm deutlich erhöhte Werte erkennen. Im Schwangerenharn ist nach WERLE<sup>27</sup> eine Diaminoxydasevermehrung nicht anzutreffen, weil das Nierenfilter für das Ferment nicht durchlässig ist. Man kann also sagen, daß der Diaminoxydasegehalt aller untersuchten Sekrete des menschlichen Körpers mit Ausnahme von

Schwangerenvaginalsekret, Colostrum und Muttermilch, verglichen mit den Spermawerten praktisch gleich Null ist. Die Differenz gegenüber den für Spermaflecken gefundenen Diaminoxydaseswerten war so groß, daß eine Abgrenzung ohne Schwierigkeiten möglich erschien. Es war jedoch zu berücksichtigen, daß in der Praxis nicht immer so ausgiebige Flecken vorliegen, wie sie durch 1 ccm Sperma zustande kommen; deshalb war zu untersuchen, von welcher Größenordnung an sich Spermaflecken durch Bestimmung der Diaminoxydase nachweisen lassen. Es wurden deshalb steigende Mengen Sperma von 1 Tropfen = 0,05 ccm an zu Flecken verarbeitet; die Untersuchung der Flecken erfolgte nach 1 Tag wie oben beschrieben. Da noch eine

etwaige Beeinflussung des Ansatzes durch die verwendeten Unterlagen auszuschließen war, wurden Leerproben mit Extrakten aus Seide, Kunstfasergewebe, Baumwolle und Wolle durchgeführt; es fand kein Histaminabbau statt.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß der Extrakt

eines Fleckens aus 0,2 ccm Ejakulat  $7,2 \gamma$  Histamin abbaute. Der für Schwangerensekrete ermittelte Höchstwert liegt bei 4,0; dabei handelte es sich um sehr reichliches Material aus Colostrum und Vaginalsekret. Der Grenzwert, d. h. der kleinste Diaminoxydaseswert, welcher zum Spermanachweis gefordert werden muß, läge nach dem Ergebnis dieses Versuches also mindestens bei 5,0. Da der Wert von Spermaflecken aus 0,2—0,3 ccm Ejakulat bei 7,2 bzw. 12 liegt, wäre die geringste als Fleck auf diese Weise nachweisbare Spermamenge mit 0,2—0,3 ccm anzunehmen. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß dieser Rechnung der höchstmögliche Grenzwert zugrunde gelegt wurde; es wäre denkbar, daß man in der Praxis, z. B. bei der Untersuchung von Flecken in der Unterwäsche eines mißbrauchten Kindes, eine Schwangerschaft sicher ausschließen könnte. In diesem Fall hätte man mit einem Grenzwert zu rechnen, der sicher unter 1 liegt, und könnte demnach bereits einen Diaminoxydaseswert von 1,5 als für Sperma beweisend erachten; dies entspräche einer Spermamenge von 0,1—0,05 ccm (= 1—2 Tropfen Ejakulat). Tabelle 4 zeigt einige Beispiele, in denen die Materialmenge unbekannt war; in der letzten Spalte zum Vergleich der mikroskopische Befund.

Die Extraktion des Fleckenmaterials wurde in dieser Reihe auf 4 Stunden ausgedehnt. Man sieht, daß die Spermafleckenextrakte

Tabelle 3.

Spermafleck aus ccm Ejakulat	Ansatz mit Histamin in $\gamma$	Abgebaute Histaminmenge in $\gamma$ = Diaminoxydaseswert
0,05	10	1,5
0,1	10	4,0
0,2	10	7,2
0,3	20	12
0,4	20	15
0,5	20	19
1,0	50	36

Tabelle 4.

Art des Materials	Ansatz mit Histamin in γ	Abgebauta Histaminmenge in γ	Mikroskopischer Befund
Spermafleck 4 Tage . . .	4	4	Sperm. +
Vaginalsekret 2 Tage . . .	4	0	Glyk. Epith.
Spermafleck 1 Woche . . .	20	15	Sperm. (+)
Fluor 4 Tage . . . . .	20	0,4	Epith. Leuko.
Azoospermie 5 Tage . . .	5	5	—
Vaginalsekret Go. 5 Tage	5	0	Leuko., Go., Ep.
Spermafleck ? . . . .	10	4,8	Sperm. (+)
Cervicalabstrich . . . .	10	0,1	—

meist die jeweils angebotene Histaminmenge vollkommen abgebaut haben, während von den zum Vergleich angesetzten Flecken weiblicher Genitalsekrete Histamin gar nicht oder nur minimal angegriffen wurde.

#### Diaminoxydasebestimmung in Blutflecken.

Nachdem MARCOU<sup>25</sup> beobachtet hatte, daß das Blut von Gebärenden eine erhöhte Histaminaktivierungsfähigkeit besitzt, zeigten WERLE und EFFKEMANN<sup>23</sup>, daß dieser Histaminabbau auf einer Vermehrung der Diaminoxydase im Blut von Schwangeren beruht, welcher schon im 2. Schwangerschaftsmonat nachweisbar ist. Die von diesen Autoren hierauf begründete Methode zum Schwangerschaftsnachweis wurde von ZELLER und BIRKHÄUSER<sup>25</sup> und LABHARDT<sup>31</sup> nachgeprüft. Der Diaminoxydasespiegel im Schwangerenblut steigt bis zum 7. Monat an und bleibt dann etwa auf gleicher Höhe bis zur Geburt. Nach der Geburt fallen die Diaminoxydaseswerte innerhalb von 8 Tagen zur Norm ab; das gleiche ist der Fall bei gestörter oder unterbrochener Schwangerschaft<sup>23</sup>. Bei Extrauteringravität ist der Diaminoxydaseblutspiegel nicht erhöht. Die Diaminoxydase ist nur im mütterlichen Kreislauf vermehrt<sup>24</sup>; im Fetalblut ist der Histamingehalt etwa 3mal so hoch als der des mütterlichen Blutes, der Diaminoxydasegehalt jedoch nicht erhöht (Undurchlässigkeit des Placentarfilters für das Ferment). Die Placenta wurde von DANFORTH<sup>17</sup>, ZELLER<sup>7</sup> und WERLE<sup>18</sup> als besonders diaminoxydasesreich betroffen, so daß in ihr die Bildungsstätte für den Diaminoxydaseüberschuß während der Gravidität zu vermuten war. Nach Ausstoßung der Placenta tritt die Diaminoxydase rasch in das umgebende Placentarblut über. Im Uterus selbst fanden sich sehr niedrige Diaminoxydaseswerte neben einem außerordentlich hohen Histamingehalt<sup>18</sup>. Die Bedeutung der erhöhten Diaminoxydaseaktivität während der Gravidität liegt vermutlich darin, daß der Uterus, der besonders am Ende der Schwangerschaft gegenüber

Histamin sehr empfindlich ist, vor dessen wehenerregender Wirkung geschützt werden soll; andererseits könnte das mit Beginn der Wehen frei werdende Histamin in der Blutbahn durch die Diaminoxydase abgefangen und dadurch eine schädliche Kreislaufwirkung vermieden werden<sup>19, 30</sup>.

Nach diesen Angaben und den für Spermaflecken gefundenen Ergebnissen lag es nahe, den Nachweis von Geburts- und Abortusblutflecken durch Bestimmung der Diaminoxydase zu versuchen.

*a) Unterscheidung von mütterlichem und kindlichem Blut.*

Die von WERLE und EFFKEMANN<sup>23</sup> für frisches Schwangerenblut gefundenen Histaminabbauwerte bewegen sich in der Größenordnung zwischen 1 und 30 γ; bei der Entbindung lag der Diaminoxydaseswert etwa bei 20, am 1. Wochenbettstag noch bei 19. Vom 2.—8. Wochenbettstag fielen die Werte von 14 über 9, 7, 4, 3 und 2,5 zur Norm ab. Im Blut von Nichtschwangeren und Tieren finden sich Werte (für 3 ccm) von 0,1 bis höchstens 2,0<sup>23, 24, 25</sup>. Es wurde nachgewiesen, daß eine Erhöhung des Diaminoxydasespiegels bei den verschiedensten Krankheiten nicht auftritt<sup>25, 26</sup>. Bei Tieren ist während der Gravidität der Diaminoxydasegehalt der Organe, nicht aber der des Blutes erhöht<sup>24</sup>.

Um die Verhältnisse bei Spuren von Geburtsblutungen im Vergleich zu Blutflecken aus Verletzungen von nichtschwangeren Frauen bzw. Männern, insbesondere von Neugeborenen kennenzulernen, wurde eine Reihe von Flecken verschiedener Herkunft unter den genannten Gesichtspunkten untersucht. Das unter der Geburt und nach Aussstoßung der Placenta aus dem mütterlichen Genitale austretende Blut wurde zur Herstellung von Flecken verschiedener Größe auf Filtrierpapier gebracht; dabei kamen Mengen von 1—5 ccm zur Verwendung. Zur Gewinnung kindlichen Blutes wurde nach Unterbindung der Nabelschnur der nabelseitige Stumpf punktiert und aus analogen Blutmengen unter gleichen Bedingungen Flecken hergestellt. Die Normalblutproben wurden bei Blutentnahmen zur Blutgruppenbestimmung von den verschiedensten Personen entnommen. Zu verschiedenen Zeiten nach der Eintrocknung wurden die Flecken zerschnitten und mit Tyrodelösung durch 20 Min. bis zu 4 Stunden extrahiert. Die Extrakte wurden, wie bei der Verarbeitung von Spermaflecken beschrieben, mit Histamin angesetzt und die inaktivierte Histaminmenge pharmakologisch bestimmt.

Der ermittelte Histaminabbau ist in der letzten Spalte prozentual ausgedrückt. Die Errechnung des Prozentwertes ist aber nicht zur Beurteilung der Diaminoxydaseaktivität eines Extraktes verwertbar, sondern soll nur zur Veranschaulichung dienen, um den Einfluß der

Tabelle 5.

Art des Materials	Ansatz mit Histamin in $\gamma$	Abgebaute Histaminmenge in $\gamma$ = Diaminoxydasewert	Abbau in %
Geburtsblutfleck	1 Tag . . . . .	20	20
	1 Tag . . . . .	30	22
	1 Monat . . . . .	20	16
	1½ Monat . . . . .	10	10
	2 Monate . . . . .	20	18
Kindliches Blut	1 Tag . . . . .	2	0,8
	1 Tag . . . . .	20	4
	1 Woche . . . . .	4	1,0
	1 Woche . . . . .	2	0,1
	1 Monat . . . . .	2	0
Normalblut . . .	1 Tag . . . . .	2	0
	1 Monat . . . . .	20	1,2
	1 Woche . . . . .	10	1,0
	12 Tage . . . . .	4	0,7
			17,5

Histamindosierung bei der Herstellung der Ansätze darzutun. Der Histaminabbau steigt mit steigender Histaminmenge an, jedoch verläuft die Abbaukurve keineswegs parallel zur Dosierungskurve (Eigenhemmung). Bei der Beurteilung der Proben hält man sich am besten, wie WERLE und EFFKEMANN<sup>26</sup> dies für ihre Schwangerschaftsreaktion angaben, an die absolute abgebaute Histaminmenge, welche dem Diaminoxydasewert des Ansatzes entspricht.

Derdurchschnittlich für die untersuchten Geburtsblutflecken gefundene Diaminoxydasewert liegt bei 15—20  $\gamma$ , für kindliches und Normalblut bei 0—4  $\gamma$ .

Diese Differenz genügt ohne weiteres zur Unterscheidung von mütterlichem und kindlichem Blut; in Tabelle 6 hierfür einige Beispiele. Praktisch kommt die Differenz am deutlichsten heraus, wenn man die Ansätze mit kleineren und vergleichbaren Histaminmengen beschickt; mütterliches Blut wird dann einen vollständigen Abbau zeigen, während kindliches Blut gar keinen oder nur geringen Abbau verursacht.

#### b) Unterscheidung von Abortus- und Menstrualblut.

Nach den Ergebnissen von WERLE und EFFKEMANN<sup>23</sup> ist bei der Unterbrechung der Gravidität ein alsbaldiger Abfall der Diaminoxydaseaktivität im Blut zu erwarten. Entsprechende Versuche sollten

Tabelle 7.

Art des Materials	Ansatz mit Histamin in γ	Abgebauta Histaminmenge in γ	Bemerkungen
Abortus Mens.	V . . . . .	20	1. Tag
	III . . . . .	10	3. Tag
	II . . . . .	4	2. Tag
	IV . . . . .	4	6. Tag
	IV . . . . .	4	2. Tag
	III . . . . .	10	4. Tag
Menstrualblut . . .	V . . . . .	20	2. Tag
	{ . . . . .	4	0,1
	{ . . . . .	2	0
	{ . . . . .	10	0,7
			3. Tag } der Regel

zeigen, ob und inwieweit die Diaminoxydasebestimmung in Flecken von Abortusblut erhöhte Werte ergibt. Weiterhin war zu prüfen, ob vielleicht auch in Menstrualblutflecken eine Erhöhung der Diaminoxydaseaktivität zu finden ist, oder ob auf Grund der Diaminoxydasebestimmung eine Unterscheidung von Abortus- und Menstrualblut möglich ist. Die untersuchten Flecken waren meist aus etwas größeren Mengen gewonnen (3—6 ccm); Versuchsbedingungen wie oben.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, stellte sich heraus, daß in Menstrualblutflecken eine Erhöhung der Diaminoxydaseaktivität nicht nachweisbar ist. Abortusblutflecken sind durch vermehrten Diaminoxydasegehalt ausgezeichnet, wenn die Unterbrechung nicht zu lange zurückliegt und wenn der Abort jenseits des 2. Monats erfolgte. Die gefundenen Diaminoxydaseswerte liegen niedriger als die für Geburtsblutflecken ermittelten, jedoch deutlich höher als die von kindlichem und Normalblut.

Bevor ich zu einer Besprechung der Versuchsergebnisse übergehe, soll noch die *Versuchsmethodik* in verschiedenen Einzelheiten näher beschrieben werden.

1. *Die Extraktion der Flecken* wird mit der physiologischen Kochsalzlösung, Phosphapuffer vom pH 7,2 oder (am besten) mit Tyrodelösung vorgenommen. Die zur Extraktion des Fleckenmaterials verwendete Menge richtet sich nach der Größe der Flecken; sie ist auf jeden Fall so zu wählen, daß sie ausreicht, um neben dem Ansatz noch einen Leerversuch mitlaufen zu lassen. Die Extraktionszeit darf nicht zu kurz und nicht zu lang gehalten werden: Bei zu kurzer Extraktion wird das Ferment nur zu Bruchteilen in Lösung gehen, bei zu langer Extraktion könnte es zerstört werden. Bei frischen Flecken genügt eine Stunde, bei älteren ist eine längere Extraktion unter öfterem Umrühren, von etwa 4 Stunden vorzuziehen.

2. Eine *Dialyse der Extrakte* grundsätzlich durchzuführen, ist nicht notwendig. In manchen Fällen (s. unten) empfiehlt es sich jedoch, der weiteren Verarbeitung eine kurzdauernde (4—6 Stunden) Dialyse der Extrakte gegen Puffer oder Tyrode voranzuschicken.

3. Zur Herstellung der Ansätze werden die Extrakte in die Reaktionströge des Glasarmes nach KREBS im Wasserbad von 0° einpipettiert, und zwar von jedem Extrakt gleiche Teile in 2 Gefäße. Zuvor hat man sich aus „Imido“-Ampullen, welche 1000 γ Histamin in 1 ccm enthalten, Verdünnungen mit 100, 10 und 1 γ in 1 ccm hergestellt. Die Krebsgefäße sind mit Fettstift beschriftet, etwa so, daß die Gefäße für den Hauptversuch neben der Versuchsnummer mit b, die Minuskontrollen mit a bezeichnet sind. Nun wird den b-Gefäßen die gewünschte Menge Histamin zugefügt und bis zur vollen Kubikzentimeterzahl mit Tyrodelösung aufgefüllt; die a-Gefäße werden nur mit Tyrodelösung auf das Volumen der b-Gefäße gebracht.

4. Zur Reaktion werden die Gefäße an die gefetteten Schlitte des Glasarmes angeschlossen und mit Gummiringen gesichert. Das aus einer Vorratsflasche mit Sauerstoff durchströmte System wird im WARBURGSchen Schüttelthermostaten bei 37—38° durch 2 Stunden geschüttelt. Die Reaktionszeit kann auch kürzer (1,5 Stunden) oder länger (3—4 Stunden) gewählt werden, muß aber bei verschiedenen Versuchen gleichbleiben, wenn man vergleichbare Werte erhalten will. Nach Abschluß der Reaktion werden die Gefäße wieder in ein Wasserbad von 0° verbracht.

5. Die Auswertung der Ansätze erfolgt dergestalt, daß die noch vorhandene Histaminmenge am überlebenden, atropinisierten Meerschweinchendünndarm nach MAGNUS biologisch bestimmt wird. Ein kleineres Tier (das Geschlecht spielt keine Rolle) wird durch Nackenschlag betäubt und entblutet. Man löst das untere Ende des Dünndarmes und das letzte Dickdarmstück vom Mesenterium; die letzten 20 cm des am Blinddarm endigenden Dünndarms erwiesen sich den Voruntersuchern als am geeignetsten; ich zog in vielen Fällen ein Dickdarmstück, welches kräftiger ist und länger überlebt, vor. Der Darm wird mit einer Spritze unter zartem Druck ausgespült und sofort in Tyrodelösung gelegt; im Eisschrank bleibt er etwa 24 Stunden verwendungsfähig. Zur Messung schneidet man ein etwa 1 cm langes Darmstück heraus und knüpft es zwischen 2 Seidenfäden, von denen einer an einem Glasgalgen, der andere an dem Ende des Schreibhebels befestigt wird. Der Galgen mitsamt dem Darm taucht in ein sauerstoffdurchperltes Tyrodebad mit Zuflußansatz und Überlauf, welches aus einer Vorratstyrodeflasche gespült werden kann und sich seinerseits in einem Wasserbad von 37—38° befindet. Die Spülflüssigkeit muß vorgewärmt sein; es werden

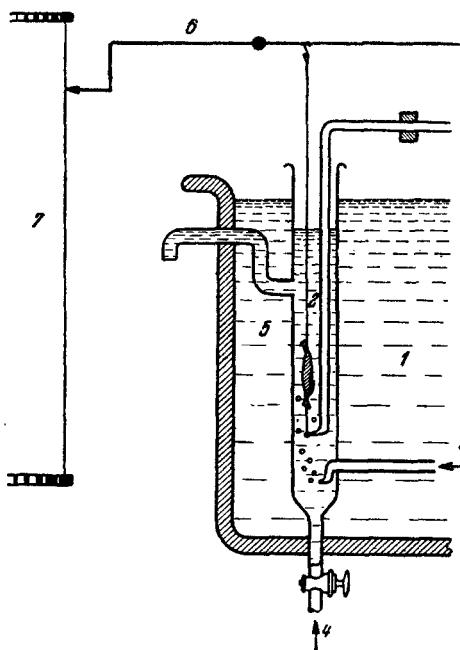


Abb. 1. Apparatur zur Auswertung des Histamins am überlebenden, atropinisierten Meerschweinchendünndarm nach MAGNUS (angegeben von WERLE). 1 Thermostat; 2 Bad mit Tyrodelösung; 3 Sauerstoffzufuhr; 4 Zufluß für Tyrodelösung; 5 Überlauf; 6 Schreibhebel (schematisch); 7 Kymographion.

ihr 0,5 ccm einer 0,1%igen Atropinlösung pro 1 zugesetzt. Die Übertragung der Darmkontraktionen erfolgt über einen leicht beweglichen Schreibhebel im Verhältnis 1 : 7 auf ein Kymographion. Nach Einspannung des Darmes verstreicht meist einige Zeit, bis der Darm sich akklimatisiert hat (etwa 15 Min.); die dann folgende Zeit mehr oder weniger lebhafter Eigenkontraktionen muß noch abgewartet werden, bevor man mit der Messung beginnen kann. Nun werden mit einer 0,5- oder 1-ccm-Injektionsspritze (Tuberkulinspritze) mit langer Kanüle der Badflüssigkeit entsprechende Mengen der Reaktionslösungen zugesetzt und die erfolgten Ausschläge mit den Ausschlägen einer in gleicher Weise zugesetzten Histamin-Standardlösung am Kymographion vergleichend registriert und ausgewertet. Zuerst ist immer die Kontrolllösung aus dem a-Gefäß zu spritzen; dann spült man und wartet die Entspannung des Darmes ab, um nun eine gleiche Menge der Reaktionslösung aus dem b-Gefäß auf den Darm wirken zu lassen; schließlich wird zum Vergleich eine bekannte Menge der Standardlösung nachgespritzt. Das Vorschalten der (histaminfreien) Kontrolllösung ist wichtig, weil manche Extrakte von sich aus eine darmkontrahierende Wirkung besitzen; diese Eigenkontraktion ist bei der Auswertung von dem Histaminausschlag abzuziehen.

Besonders bei Frischsperma, aber auch bei Extraktten aus Spermaflecken findet man eine starke autochthone Darmwirkung der Minuskontrollen; der Darm entspannt nach der Spülung auch nur langsam. Merkwürdigerweise war diese Erscheinung bei Azoospermie stärker anzutreffen als bei Normalsperma. Nach WERLE<sup>32</sup> ist diese darmkontrahierende Wirkung der Substanz „P“ (v. EULER und GADDUM<sup>33</sup>) zuzuschreiben, welche im Sperma in Verbindung mit der blutdrucksenkenden Substanz Vesiglandin (v. EULER<sup>34</sup>) reichlich vorhanden ist. Die niedermolekulare Substanz „P“ passiert Cellophanmembranen und kann deshalb durch Dialyse aus den Extraktten entfernt werden.

Da die Wirkung des Faktors „P“ auf den Darm ausgesprochen störend ist, empfiehlt es sich, Spermafleckenextrakte vor der weiteren Verarbeitung kurz zu dialysieren.

Bei der Auswertung ist zu beachten, daß nur die Hälfte der extrahierten Fermentmenge zur Wirkung kam, weil die andere Hälfte zur Kontrolle ohne Histamin angesetzt wurde.

Als Standardlösung ist die gleiche Lösung zu verwenden, welche zur Beischickung der Ansätze gedient hat. Ist in einem Ansatz eine hohe Histaminmenge zu erwarten, so muß die Reaktionsflüssigkeit vor der Auswertung entsprechend verdünnt werden; zu große Histamindosen bringen den Darm zum Absterben.

*Versuchsbeispiel.* Ein (Abortus-)Blutfleck wird zerschnitten, in 4 ccm Tyrodelösung eingeweicht und unter wiederholtem Umrühren 4 Stunden stehen gelassen. Dann wird die Flüssigkeit abgegossen und das Material ausgepreßt. Von dieser Extraktflüssigkeit werden je 1,5 ccm in Krebsgefäß a und b einpipettiert. Dem Gefäß b werden 0,2 ccm einer Histaminlösung, welche 100 γ Histamin in 1 ccm enthält, zugefügt (= 20 γ) und der Ansatz mit 0,3 ccm Tyrodelösung zu einem Gesamtvolumen von 2 ccm ergänzt. Dem Gefäß a wird dementsprechend 1 ccm Tyrodelösung zugefügt. Nach Ablauf der Reaktion werden die Lösungen 10fach verdünnt (Tyrodelösung zu einem Gesamtvolumen von 20 ccm), so daß 1 ccm der Reaktionslösung nunmehr 1 γ Histamin enthalten müßte. Von der Lösung a

werden 0,5 ccm gespritzt; das Kymographion registriert keinen Ausschlag (I). Die Injektion von 0,5 ccm der Lösung b ergibt einen Ausschlag von 16 mm Höhe (II). Die Vergleichsinjektion von 0,5 ccm (= 0,5 γ) der Standardhistaminlösung, welche 1 γ in 1 ccm enthält, ergibt einen Ausschlag von 20 mm Höhe (III). Die Injektion von 0,4 γ Histamin ergibt einen Ausschlag von 16 mm Höhe (IV).

*Auswertung.* 0,5 γ Histamin bewirken einen Ausschlag von 20 mm Höhe (III). In der gespritzten Reaktionslösung (0,5 ccm) hätten im Falle, daß kein Histamin abgebaut worden wäre, ebenfalls 0,5 γ Histamin enthalten sein müssen; der Ausschlag hätte also ebenfalls eine Höhe von 20 mm erreichen müssen. Der Ausschlag II ist aber nur 16 mm hoch, was einer Histaminmenge von 0,4 γ (VI) entspricht. Es sind also 80% der angebotenen Histaminmenge übriggeblieben; für den Gesamtansatz berechnet, ergibt sich somit ein Abbau von 4 γ (= 20% von 20 γ). Der Diaminoxydasewert des halben Extraktes ist also für einen Ansatz mit 20 γ Histamin = 4.

### Diskussion der Versuchsergebnisse.

Der Nachweis von Samenspuren spielt bei der Aufklärung von Sexualdelikten eine ausschlaggebende Rolle. Zur Methodik des Spermanachweises in Flecken ist in einer Vielzahl von Arbeiten Stellung genommen worden. Als beweisend für das Vorhandensein von Sperma wurde bis in die neueste Zeit nur der morphologische Nachweis des vollständigen Spermatozoons angesehen. Von allen Untersuchern wurde auf die Schwierigkeiten hingewiesen, die bei dem Aufsuchen der Samenfäden in Maceraten und Geweben im ungefärbten und gefärbten Präparat auftreten können. Die Schwierigkeit des Spermanachweises wird in Fällen von Azoospermie zur Unmöglichkeit. Aus diesen Gründen war man seit jeher bemüht, sich mit Hilfe chemischer Methoden vom morphologischen Nachweis der Spermatozooen freizumachen; die verschiedenen mikrochemischen Spermareaktionen (FLORENCE, BARBERIO, NIEDERLAND usw.) blieben aber trotz mannigfacher Modifikationen nur Vorproben. In neuerer Zeit wurde von PURANEN<sup>35</sup> ein mikrochemischer Spermanachweis mittels Naphtholgelb S angegeben, welcher spezifisch für Sperma und auch bei Azoospermie positiv sein soll. Außer einer Mitteilung von BELONOSCHKIN<sup>36</sup> fehlen bisher Erfahrungen mit dieser Methode\*.

Die vorstehend mitgeteilten Versuche über Diaminoxydasebestimmungen in Spermaflecken zeigen vielleicht einen neuen Weg für den Spermanachweis in Fällen, in denen der morphologische Nachweis nicht gelingt. Die Methode hat zur Voraussetzung, daß das vorliegende Material einigermaßen reichlich ist; bei sehr kleinen Flecken gelangt man kaum zu sicheren Resultaten. Es bleibt festzuhalten, daß Diaminoxydaseswerte über 5,0 in Flecken, die nicht Blutflecken sind, nur durch Sperma zustande kamen. Ein Fleck von 0,2 ccm Sperma zeigte

\* Versuche zur Nachprüfung der PURANENSchen Methode werden zur Zeit durchgeführt; ihre Mitteilung erfolgt später.

bereits einen Abbauwert von 7,2, Flecken von 1,0 ccm zeigten Diaminoxydasewerte zwischen 30 und 60. Diese Werte wurden auch von Flecken aus Schwangerenvaginalsekret, Colostrum oder Muttermilch (höchster Diaminoxydasewert 4,0) nie erreicht. In der Praxis kann auch das Ergebnis kleinerer Diaminoxydasewerte Beweiswert gewinnen, wenn eine Schwangerschaft bei der Trägerin des zu untersuchenden Beweisstückes ausgeschlossen werden kann. Diese Möglichkeit dürfte, zumal bei Fällen von Mißbrauch Minderjähriger und widernatürlicher Unzucht, nicht gar zu selten gegeben sein. Da Erfahrungen darüber, ob die Diaminoxydase der Spermaflecken bei längerem Altern der Flecken, eventuell unter besonderen Bedingungen (Erhitzen, Waschen, Sonnenbestrahlung) zerstört wird, noch fehlen\*, ist zunächst nur der positive Ausfall der Probe verwertbar. Die Bedeutung der Ergebnisse für den forensischen Spermanachweis, vorzüglich in Fällen von Azoospermie, liegt auf der Hand.

*Die Unterscheidung von mütterlichem und kindlichem Blut* spielt gegebenenfalls in Kindsmordfällen eine Rolle, wenn z. B. bei Kindstötung durch scharfe Gewalt die Beschuldigte ihr vorgehaltene Blutspuren durch die Geburtsblutung zu erklären sucht. Zur Klärung derartiger Fälle wurde von VOLLHARDT<sup>37</sup> der Nachweis der Vermehrung des Fett- und Lipoidgehaltes im Schwangerenblut herangezogen; dem Ausfall der Probe kann Beweiskraft kaum beigemessen werden. Die ABBERHALDENSCHE Schwangerschaftsreaktion hatte nach Untersuchungen von NIPPE und VOLLHARDT<sup>38</sup> keine eindeutigen Ergebnisse.

Die Bestimmung des Diaminoxydasewertes in derartigen Flecken zeigte, daß die Abbauwerte für mütterliches Blut bei 15—20 γ, für kindliches Blut bei 0—4 γ liegen. Findet sich bei Ansätzen mit kleineren Histaminmengen ein vollständiger Abbau, so liegt mütterliches Blut vor. Die Unterscheidung mütterlichen und kindlichen Blutes bzw. die Erkennung von Geburtsblut ist demnach mit Sicherheit möglich, wenn das Ergebnis positiv ist. Dem negativen Ausfall der Probe Beweiskraft zuzubilligen, erscheint auch hier noch zu gewagt.

*Die Unterscheidung von Abortus- und Menstrualblut* ist in Abtreibungsfällen von Bedeutung, wenn die Beschuldigte ihr vorgehaltene, von dem Abortus herführende Blutspuren als von der Periode stammend zu erklären sucht. In der Praxis konnte bisher der Nachweis fetalen Materials, also von Chorionzotten und Fruchtwasserbestandteilen, in der Spur als sicheres Unterscheidungsmerkmal des Abortusblutes gegenüber Menstrualblut gewertet werden; der Nachweis dieser Bestandteile dürfte aber vielfach nicht gelingen.

Nach den vorstehenden Untersuchungsergebnissen erscheint eine Unterscheidung derartiger Spuren durch Bestimmung des Diamin-

\* Entsprechende Versuche sind begonnen und werden später mitgeteilt.

oxydaseswertes grundsätzlich nur im positiven Sinne möglich. Wenn ein erhöhter Diaminoxydasegehalt des Materials gefunden wird, handelt es sich um Abortusblut; ein Fehlen der Diaminoxydase läßt einen Rückschluß auf die Herkunft des Fleckens nicht zu, weil Abortusblutflecken nur dann durch vermehrten Diaminoxydasegehalt ausgezeichnet sind, wenn die Blutung der Anfangszeit der Eiablösung entstammt, und wenn der Abortus jenseits des 2. Monats erfolgte. In Menstrualblut war eine Erhöhung der Diaminoxydaseaktivität nicht nachweisbar.

Die Bedeutung des Nachweises erhöhter Diaminoxydaseswerte in Blutspuren könnte schließlich noch in anderer Hinsicht Bedeutung gewinnen. Wenn es z. B. die Aufgabe des Untersuchers wäre, festzustellen, ob eine Blutspur von Verletzungen einer (schwangeren) Frau oder einer anderen (nichtschwangeren) Person herrührt, und die Blutgruppenbestimmung nicht zum Ziel führt, so böte die Diaminoxydasebestimmung eine weitere Möglichkeit, um zu einem Ergebnis zu gelangen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die durchgeführten Diaminoxydasebestimmungen in verschiedenem Spurenmaterial verwertbare Ergebnisse gezeitigt haben, welche die Mitteilung wohl rechtfertigen. Da einerseits reichlichere Materialmengen als im allgemeinen üblich verarbeitet werden müssen, und andererseits die Methodik nicht einfach ist und ihre Beherrschung einige Übung voraussetzt, dürfte das Verfahren den Fällen vorbehalten bleiben, in denen einfachere, insbesondere morphologische Nachweismethoden versagen. Die Auswertung der Ergebnisse bedarf gleichfalls einer gewissen Kritik, weil es sich um eine biologische Methode handelt, welche die Angabe absoluter Zahlen nicht gestattet. So müssen einerseits die gefundenen Abbauwerte mit den angebotenen Histaminmengen in Beziehung gesetzt werden, um ein zutreffendes Bild der Diaminoxydaseaktivität des betreffenden Extraktes zu erhalten; andererseits muß die zur Extraktion gewählte Materialmenge berücksichtigt werden. Kleinste Spuren sind für die Methode nicht zugänglich; zu große Substanzmengen wiederum könnten zu Fehlbeurteilungen Veranlassung geben, weil sich die geringe physiologische Diaminoxydaseaktivität bei Verwendung größerer Quantitäten über den Grenzwert steigert. Am besten berechnet man aus der schätzungsweise vorliegenden oder annähernd gemessenen (Wägung der Unterlage vor und nach der Extraktion) Trockensubstanz die ergossene Flüssigkeitsmenge überschlagsweise und geht über Werte von 5 ccm nicht hinaus.

Im übrigen konnte aber gezeigt werden, daß die Diaminoxydasebestimmung vielleicht imstande ist, in bestimmten Fällen Lücken auszufüllen, welche die zur Zeit geübte Spurenexpertise noch aufweist;

die Methode wird deshalb zur Nachprüfung in praktischen Fällen empfohlen.

#### *Zusammenfassung.*

Zur Bestimmung des Diaminoxydaseswertes bei Spurenuntersuchungen wurde die Inaktivierung von Histamin durch Diaminoxydase benutzt; die Auswertung der Ansätze erfolgte nach dem Vorgang WERLES am isolierten, atropinisierten Meerschweinchendarm. Die Methode wurde in ihrer Anwendung für den vorliegenden Zweck ausführlich dargestellt und besprochen. Die experimentellen Untersuchungen an Spurenmaterial verschiedener Herkunft hatten folgende Ergebnisse:

1. Es wurde gezeigt, daß Diaminoxydase grundsätzlich auch in angetrocknetem Material nachgewiesen werden kann.
2. Erhöhte Diaminoxydaseswerte fanden sich in Flecken von Sperma (auch bei Azoospermie), Geburts- und Abortusblut. Die Diaminoxydaseaktivität in Flecken von Schwangerenvaginalsekret, Colostrum und Frauenmilch blieb hinter derjenigen der erstgenannten Substanzen weit zurück. In Menstrualblut und allen übrigen untersuchten Sekreten wurde eine Vermehrung der Diaminoxydaseaktivität nicht angetroffen.
3. Der Nachweis von Spermaflecken durch Bestimmung des Diaminoxydaseswertes ist möglich, wenn das vorliegende Material einigermaßen reichlich ist. Die Methode hat in Fällen von Azoospermie erhöhte Bedeutung.
4. Es wurde gezeigt, daß die Unterscheidung von mütterlichem und kindlichem Blut ebenfalls durch Bestimmung des Diaminoxydaseswertes möglich ist.
5. Unter bestimmten Voraussetzungen ist auch die Unterscheidung von Abortus- und Menstrualblut mit der angegebenen Methode möglich.
6. Der Ausfall der Reaktion ist jeweils nur im positiven Sinne verwertbar.

Die Untersuchungen werden, besonders hinsichtlich des Verhaltens des Fermentes beim Altern der Spuren, fortgesetzt.

Herrn Dozent DDr. E. WERLE, München, danke ich für die liebenswürdige praktische und theoretische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

#### **Literatur.**

- <sup>1</sup> BEST, C. H.: J. Physiol. (Brit.) **67**, 256 (1929). — <sup>2</sup> BEST, C. H., DUDLEY and THORPE: J. Physiol. (Brit.) **62**, 397 (1927). — <sup>3</sup> ZELLER, E. A., B. SCHÄR u. S. STAETHLIN: Helvet. chim. Acta **22**, 837 (1939). — <sup>4</sup> PUGH and QUARTEL: Biochem. J. (Brit.) **31**, 2306 (1937). — <sup>5</sup> ZELLER: Naturw. **26**, 282 (1938). — <sup>6</sup> ZELLER, STERN u. WENK: Helvet. chim. Acta **23**, 3 (1939). — <sup>7</sup> EDELBACHER u. ZELLER: Helvet. chim. Acta **20**, 717 (1937). — <sup>8</sup> BEST and McHENRY: J.

- Physiol. (Brit.) **70**, 349 (1930). — <sup>9</sup> MCHENRY and GAVIN: Biochem. J. (Brit.) **26**, 1365 (1932). — <sup>10</sup> ZELLER: Helvet. chim. Acta **21**, 1645 (1938). — <sup>11</sup> KIESE, M.: Biochem. Z. **305**, 22 (1940). — <sup>12</sup> ZELLER: Helvet. chim. Acta **23**, 1502 (1940). — <sup>13</sup> WERLE, E. u. HERRMANN: Biochem. Z. **291**, 105 (1937). — <sup>14</sup> WERLE, E.: Biochem. Z. **309**, 61 (1941). — <sup>15</sup> ZELLER, BIRKHÄUSER, MISLIN u. WENK: Helvet. chim. Acta **22**, 1381 (1939). — <sup>16</sup> WERLE u. KOCH: Klin. Wschr. **1942**. — <sup>17</sup> DANFORTH: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **40**, 319 (1939). — <sup>18</sup> EFFKEMANN, G. u. E. WERLE: Arch. Gynäk. **170**, 173 (1940). — <sup>19</sup> WERLE u. KOCH: Beitr. Klin. Tbkr. **96**, 584 (1941). — <sup>20</sup> ZELLER u. ROBERT: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 1605. — <sup>21</sup> ALBUS, G.: Z. exper. Med. **108**, 392 (1941). — <sup>22</sup> MARCOU, L. u. ATHANASIU-VERGU: Bull. Acad. Méd. Roum. (Bucarest Fr.) **3**, 1 (1937). — <sup>23</sup> WERLE u. EFFKEMANN: Arch. Gynäk. **170**, 82 (1940). — <sup>24</sup> WERLE u. EFFKEMANN: Arch. Gynäk. **172**, 448 (1942). — <sup>25</sup> ZELLER u. BIRKHÄUSER: Schweiz. med. Wschr. **1940**, 975. — <sup>26</sup> WERLE u. EFFKEMANN: Klin. Wschr. **1940**, 717. — <sup>27</sup> WERLE: Biochem. Z. **311**, 329 (1942). — <sup>28</sup> ZELLER: Helvet. chim. Acta **24**, 256 (1940). — <sup>28a</sup> LAVES, W.: Biochem. Z. **310**, 185 (1942). — <sup>29</sup> ZELLER: Helvet. chim. Acta **21**, 880 (1938). — <sup>30</sup> ZELLER: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 293. — <sup>31</sup> LABHARDT, A.: Mschr. Geburtsh. **112**, 1 (1941). — <sup>32</sup> WERLE: In OPPENHEIMERS Handbuch der Biochemie des Menschen und Tiere, Erg.-Werk, 2. Aufl. S. 1098. Jena 1936 — <sup>33</sup> EULER, v. and GADDUM: J. Physiol. (Brit.) **72**, 74. — <sup>34</sup> EULER, v.: Arch. exper. Path. (D.) **175**, 78. — <sup>35</sup> PURANEN, U. H.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **26**, 366 (1936). — <sup>36</sup> BELONOSCHKIN, B.: Arch. Gynäk. **169**, 151 (1939). — <sup>37</sup> VOLLHARDT: Vjschr. gerichtl. Med. **3**, 48 (1914). — <sup>38</sup> NIPE: Ärzt. Sachverstzg **1913**.