

## Bestimmung der sauren Phosphatase der Erythrocyten im Leichenblut

G. HEIDEL und W. REIMANN

Institut für Gerichtliche Medizin der Medizinischen Akademie „C. G. CARUS“, Dresden (Direktor: Prof. Dr. W. REIMANN)

Eingegangen am 20. März 1967

Seit der Entdeckung des Polymorphismus der sauren Phosphatase der Erythrocyten (HOPKINSON, SPENCER and HARRIS, 1963) eröffnet sich ein weites Feld der Erforschung des Verhaltens der Phosphatasestypen unter verschiedensten Bedingungen und ihrer Anwendungsmöglichkeiten. Neben dem Studium artspezifischer Typen (REIMANN und HEIDEL, im Druck) mußte das Verhalten der sauren Phosphatase der Erythrocyten im Leichenblut forensisch-medizinisch interessieren. Die sich in der Autolyse manifestierende, den Tod überdauernde Enzymaktivität bot gute Aussichten der Faßbarkeit der Phosphatasestypen im Leichenhämolysat, wobei zuerst Verfall der schwächsten Aktivität A die Bestimmbarkeitsgrenze anzeigen mußte.

### Material und Methode

#### Untersuchungsgut

Zur Untersuchung kamen Blute von 67 Leichen unseres Sektionsmaterials. Entnommen wurde Herzblut, und nur in wenigen Fällen, bei denen durch die fortgeschrittene Fäulnis kein Herzblut mehr gewonnen werden konnte, Blut aus der Vena femoralis. Die Todesursachen umfassen das gesamte Spektrum des gerichts-medizinischen Sektionsgutes vom plötzlichen Tod aus natürlicher Ursache bis zum Mord. Die Zeitspanne zwischen der Todeszeit laut Totenschein und dem Zeitpunkt der Blutentnahme bei der Sektion ist zusammen mit der Anzahl der jeweils untersuchten Proben aus Tabelle 1 zu ersehen.

Tabelle 1

Hämolsate	Zeit	Anzahl	Zeit	Anzahl
	7 Std	1	52 Std	1
	10 Std	3	66 Std	1
	14 Std	1	72 Std	10
	24 Std	13	84 Std	1
	28 Std	7	96 Std	1
	32 Std	6	120 Std	1
	38 Std	1	144 Std	1
	48 Std	18	1 Monat	1

Die Hämolsate wurden auf die von RADAM und STRAUCH (1966) beschriebene Weise hergestellt. Man stellt eine Kochsalzaufschwemmung der entsprechenden Blute her, zentrifugiert diese, saugt den Überstand ab und setzt dem Erythrocytenbrei die 1,5fache Menge Aqua dest. zu. Nach Durchmischen werden die Proben in einer Eis/CaCl<sub>2</sub>-Kältemischung

für 10 min eingefroren. Danach läßt man sie zum Auftauen für 1 Std bei Zimmertemperatur stehen.

Bei einigen Bluten von Leichen mit längerer Liegezeit war es durch die hochgradige Hämolyse nicht mehr möglich, Erythrocyten durch das Zentrifugieren zu gewinnen. Wie unsere Erfahrungen zeigen, ist es in diesen Fällen durchaus möglich, das hämolytische Leichenblut ohne weitere Aufarbeitung elektrophoretisch aufzutrennen (s. auch Sekt.-Nr. 90/67).

### *Elektrophorese*

Gearbeitet wurde mit der von RADAM und STRAUCH (1966) angegebenen Methode, die wir nur in einigen Details modifizierten. Mit einem 0,012 M Phosphatpuffer (pH 6,0) wird das Gel für die horizontale Stärkegelelektrophorese bereitet, wobei sich uns in Abweichung von der Originalmethode eine Stärkekonzentration von 8,5 % als optimal erwies.

Wir verwenden eine Elektrophoresewanne mit den Innenabmessungen  $22 \times 14$  cm, die 0,7 cm hoch (220 ml) mit dem Gel gefüllt wird. Die Elektrodenkammern werden mit Brückenlösungen ungleicher Konzentration beschickt, auf der Anodenseite mit 0,4 M und auf der Kathodenseite mit 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0). Der Kathodenpuffer muß nach jeder Elektrophorese erneuert werden.

Eine hinreichend gute Auftrennung erreicht man bei einem Strom von 50 mA (Stromdichte  $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  Gelquerschnitt) bei  $+5^\circ\text{C}$  nach 14 Std Laufzeit. Der Flüssigkeitsverlust des Gels wird durch blasenfreies Auflegen einer Polyäthylenfolie gering gehalten.

Als Träger für die Hämolsate verwenden wir Filterpapierplättchen (Whatman No. 17) mit den Abmessungen  $5 \times 7$  mm. Bei einer Kammerbreite von 14 cm lassen sich 12—14 Proben gleichzeitig untersuchen.

### *Enzymnachweis*

Die von uns verwandte Substratlösung wird durch Auflösen von 250 mg Phenolphthaleindiphosphat (Pyridinsalz) in 70 ml achtfach verdünntem Brückenpuffer hergestellt. Nach dreistündigem Inkubieren des horizontal aufgeschnittenen Gels mit dem Substrat wird die Substratlösung abgesaugt. Nach Alkalisieren mit einigen Tropfen 25%iger Ammoniaklösung werden die leuchtendroten Fraktionen sichtbar.

### *Ergebnisse*

Blute von 67 Leichen mit bis zu 1 Monat Liegedauer wurden untersucht und boten in allen Fällen ein eindeutig identifizierbares Typenbild.

Da der Phosphatasetyp naturgemäß nicht bekannt war und somit auch nicht kontrolliert werden konnte, bot sich der Vergleich mit den bisher ermittelten Typenverteilungszahlen und daraus errechneten Genfrequenzen als Kontrollmöglichkeit an. Die folgenden Tabellen geben darüber Auskunft und zeigen bei der relativ kleinen Vergleichszahl unseres Materials hinlängliche Übereinstimmung.

Die Ergebnisse erlauben schon jetzt die Feststellung der sicheren Bestimmbarkeit der Phosphatasetypen im Leichenblut bis zu 7 Tagen Liegedauer der Leiche, wobei eine deutliche Diskrepanz zwischen relativ

Tabelle 2

HOPKINSON et al., 1963 (Typenverteilung bei 139 nicht verwandten Engländern)		Typenverteilung bei 67 nicht verwandten Individuen aus dem Sektionsgut des Dresdener In- stitutes für Gerichtliche Medizin	
A	0,101	A	0,090
AB	0,460	AB	0,373
B	0,345	B	0,418
AC	0,036	AC	0,045
BC	0,058	BC	0,074
Zusammen	1,000	Zusammen	1,000

Tabelle 3. Vergleich der von uns ermittelten Genfrequenzen mit den bisher bekannt gewordenen Daten

	HOPKINSON et al. (an 139 Engländern)	LAI et al. (an 369 Brasilianern)	67 Leichen unseres Sektionsmaterials
P <sup>a</sup>	0,349	0,197	0,298
P <sup>b</sup>	0,604	0,772	0,642
P <sup>c</sup>	0,047	0,031	0,060
Total	1,000	1,000	1,000

fortgeschrittenen Leichenveränderungen und unveränderter Nachweisbarkeit des jeweiligen Typs auffiel.

In einem Begutachtungsfall gelang der Nachweis sogar noch nach 1 Monat. Nachdem sich der Betroffene (Sekt.-Nr. 90/67) bis in Hüft in die Erde eingegraben hatte, verübte er Selbstmord durch Kopfschuß mit einer Pistole.

Die Leiche wurde 29 Tage nach dem Selbstmord aufgefunden, 30 Tage nach dem Selbstmord erfolgte die Leichenöffnung. Da die Leiche in der zweiten Januar- und ersten Februarhälfte bei Außentemperaturen in der Nähe des Nullpunktes ( $\pm 5^\circ \text{C}$ ) gelegen hatte, zeigte sie, obwohl sie nicht durchgefroren war, nur beginnende Fäulniserscheinungen. An beiden Wangen und beiden seitlichen Schädel- und Halspartien fanden sich ausgeprägte tierfraßbedingte Defekte der Haut und der darunterliegenden Gewebe. An Händen und Füßen fand sich eine ausgeprägte Waschhautbildung, durch welche die Haut handschuhfingerartig abgehoben werden konnte.

Da das Blut sehr hämolytisch war, wurde das Filterpapier direkt mit Herzblut getränkt. Untersucht wurde außerdem Blut aus den zentralen Bereichen eines großen subduralen Hämatoms und Blut, welches in der Umgebung der Einschußstelle am Kopfhaar angetrocknet war.

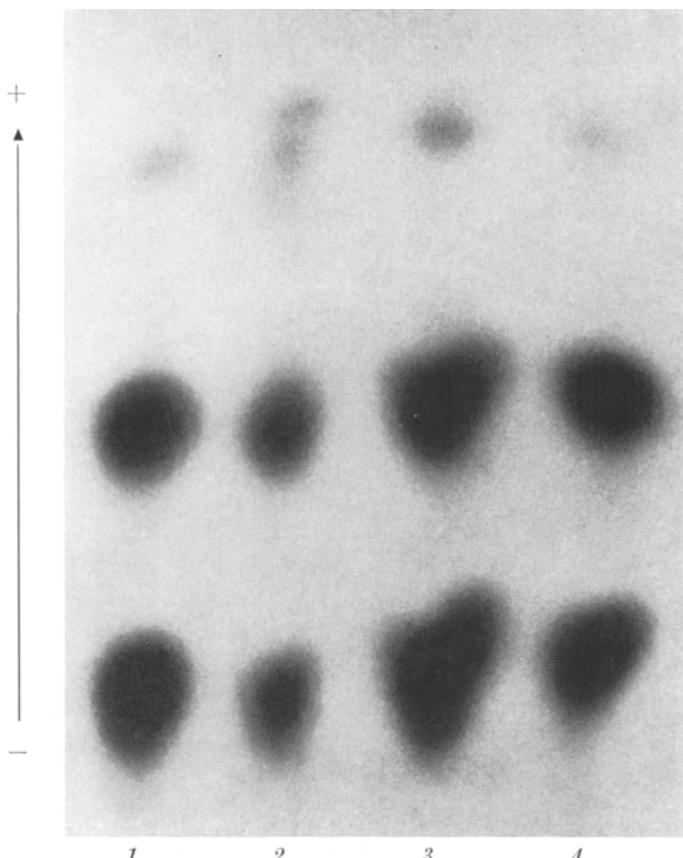


Abb. 1. Im Leichenblut nachgewiesene Typen der sauren Erythrocytenphosphatase nach einer Liegezeit von 1 Monat. 1 und 4 Herzblut; 2 am Kopfhaar angetrocknetes Blut; 3 Blut aus dem subduralen Hämatom

Das Hämatomblut und das oberflächlich angetrocknete Blut wurden in wenig destilliertem Wasser gelöst. Die gefundenen Phosphatasetypen zeigt Abb. 1.

Die Untersuchung ergab einen eindeutigen BC-Typ mit relativ großer Aktivität der einzelnen Fraktionen. Auch die Vorfraktionen, welche nach RADAM und STRAUCH (1966) nur bei frischen Bluten regelmäßig beobachtet werden können, kommen gut zur Darstellung. Das der Witte rung ausgesetzte Blut vom Kopfhaar zeigt eine Aktivitätsminderung der sauren Erythrocytenphosphatase, die sich aber in keiner Weise auf die Identifizierbarkeit des Typs auswirkt. Die deutlich größte Aktivität zeigt die Phosphatase der aus dem subduralen Hämatom entnommenen Probe.

### Diskussion

Die Untersuchungen erwiesen die Nachweisbarkeit der sauren Phosphatasetypen an der Leiche mit für die Spurenkunde hinlänglicher Sicherheit.

Der Nachweis gelingt regelmäßig länger als die Bestimmbarkeit der klassischen Blutgruppe an hämolytischem Blut. Er erweist sich damit als überlegen und kann für praktisch-diagnostische Zwecke in einschlägigen Fällen empfohlen werden.

Der Vergleich der Typen- und Genfrequenzen mit den vorliegenden Daten spricht für die Richtigkeit der ermittelten Phosphatasetypen. Weitere Untersuchungen zur Ermittlung der Grenze der Bestimmbarkeit sind im Gange.

### Zusammenfassung

Mitteilung über die Möglichkeit des Nachweises der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase im Leichenblut. Sichere Bestimmbarkeit ist bis mindestens 7 Tage Liegedauer der Leiche in deutlicher Diskrepanz zu relativ fortgeschrittenen Leichenveränderungen möglich.

### Summary

Report on determination of the types of acid phosphatase in red cells from cadaveric blood. Certain determination from 7 days to 1 month was possible in spite of developed cadaveric changes.

### Literatur

- HOPKINSON, D. A., N. SPENCER, and H. HARRIS: Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. *Nature (Lond.)* **199**, 969 (1963).  
LAI, L., S. NEVO, and A. G. STEINBERG: Acid phosphatases of human red cells: Predicted phenotype conforms to a genetic hypothesis. *Science* **145**, 1187 (1964).  
RADAM, G., u. U. STRAUCH: Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966).  
REIMANN, W., u. G. HEIDEL: Artspezifische Typen der sauren Erythrozytenphosphatase. Im Druck.

Dr. med. G. HEIDEL  
Prof. Dr. med. habil. W. REIMANN  
Institut für Gerichtliche Medizin  
der Medizinischen Akademie Dresden  
D 80 Dresden, Fetscherstraße 74