

Die Altersbestimmung von Kanüleneinstichen mittels enzymhistochemischer Methoden

L. FRIEBEL und H. WOOHSMANN

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Institut für cortico-viscerale Pathologie und Therapie, Berlin-Buch
(Direktor: Prof. Dr. R. BAUMANN)
und Institut für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität
(Direktor: Prof. Dr. O. PROKOP)

Eingegangen am 24. April 1967

Ausgehend von den grundlegenden Arbeiten RAEKALLIOS [7—11] und LINDNERS [4, 5] über die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden untersuchten wir die Frage, inwieweit eine zeitliche Analyse von Kanüleneinstichen mittels enzymhistochemischer Methoden möglich ist. Die Bedeutung dieser Fragestellung für gerichtsmedizinische Zwecke liegt auf der Hand. Von den Autoren sind bisher vielfach größere Traumen bzw. Hautwunden untersucht worden, die besonders in den späteren Stadien der Heilung Unterschiede in den Enzymquantitäten und eventuell auch -qualitäten gegenüber einem sich verhältnismäßig schnell schließenden Kanüleneinstich erwarten lassen. Uns kam es darauf an, auch diese späteren Stadien verhältnismäßig sicher festlegen zu können und überhaupt eine gewisse Norm für die zeitliche Diagnose der Kanüleneinstiche von 1—2 mm bis zur Heilung aufzustellen. Wir untersuchten Stichwunden an der Rattenhaut mit einem Durchmesser von 1,5 mm und dehnten die zeitliche Bestimmung auf 5 Tage bis kurz vor dem Abschluß des Heilprozesses aus.

Neben der möglichst genauen Bestimmung des Auftretens und Abklingens der einzelnen Enzyme interessierte uns besonders die Reproduktion der Ergebnisse und die Sicherheit der zeitlichen Bestimmung. Bezüglich des Enzymspektrums haben wir uns im wesentlichen an die Arbeiten RAEKALLIOS gehalten. Neu wurde der Nachweis der Naphthol-AS-Sulfatase und die Verwendung von Naphthol-AS-Phosphat zum Nachweis der Phosphatasen in die Altersbestimmung hereingenommen.

Methodik

Für unsere Versuche wählten wir gesunde weiße Ratten mittleren Alters. Das Rückenfell wurde mittels einer Schere gekürzt und unter leichter Äthernarkose jedem Tier entsprechend der Zahl der Enzymnachweise Kanüleneinstiche mit einer 1,5 mm im Durchmesser messen-

den Kanüle in räumlichen Abständen von 1—2 cm verabfolgt. Die Versuchstiere wurden nach 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 Std durch Dekapitieren getötet. Aus der Rückenhaut wurde jede Stichstelle mit einem 1 cm² großen Hautlappen herausgeschnitten und in Baker-Formol 4—5 Std fixiert. Für den Nachweis der Dehydrogenasen und der Amino-peptidase haben wir im Kryostaten Nativschnitte angefertigt. An jedem Tier wurden die neun angegebenen Enzymreaktionen ausgeführt. Wir haben 5 Versuchsserien durchgeführt; d.h., mit den Vorversuchen im ganzen mit 40 Ratten gearbeitet.

Folgende Enzymreaktionen wurden an den Stichkanälen getestet:

1. Amino-peptidase nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN zit. nach PEARSE, 1961.
2. Bernsteinsäuredehydrogenase nach NACHLAS, 1957 zit. nach PEARSE, 1961.
3. Laktatdehydrogenase und
4. NAD-Oxidoreduktase nach HESS u. Mitarb., 1958 zit. nach PEARSE, 1961.
5. ATPase nach WACHSTEIN und MEISEL zit. nach PEARSE, 1961.
6. Saure Phosphatase und
7. Alkalische Phosphatase nach BURSTONE, 1958.
8. Unspezifische Esterase nach SHNITKA und SELIGMAN, 1951.
9. Naphthol-AS-Sulfatase nach WOOHSMANN und HARTRODT, 1964.

Ergebnisse

Die alkalische Phosphatase zeigt 4 Std nach dem Kanüleneinstich steigende Aktivitäten, wobei zunächst vorwiegend die auswandernden Leukocyten am Wundrand reagieren. Das Maximum ist etwa nach 16 Std mit der typischen Aktivität der äußeren Zone unter Bildung eines stark reagierenden Fibroblastenringes erreicht (Abb. 1). Dann folgt ein steiler Abfall. Die positive Ringbildung verschwindet, und im 32-Stundenstadium sind nur noch Restaktivitäten und locker verteilte, aktive Fibroblasten nachweisbar (Abb. 2), die im weiteren Verlauf der Wundheilung an Zahl abnehmen bzw. ihre Aktivität verlieren (Abb. 3).

Die Naphthol-AS-Sulfatase ist gleichfalls durch ein Ansteigen der Aktivität in der äußeren Zone charakterisiert. Die Leukocyten sind mit dieser Reaktion nicht zu fassen. Das Maximum ist etwa nach 16 Std erreicht (Abb. 4) und nach 64 Std klingt die Reaktion aus.

Die saure Phosphatase zeigt sich nach 4 Std noch als Leukocyten- und Wundrandreaktion. Nach 8—32 Std steigert sich die Aktivität zu einem Maximum in der äußeren Zone. Die absinkende Tendenz ist gering, denn bis kurz vor Abschluß der Wundheilung läßt sich in den

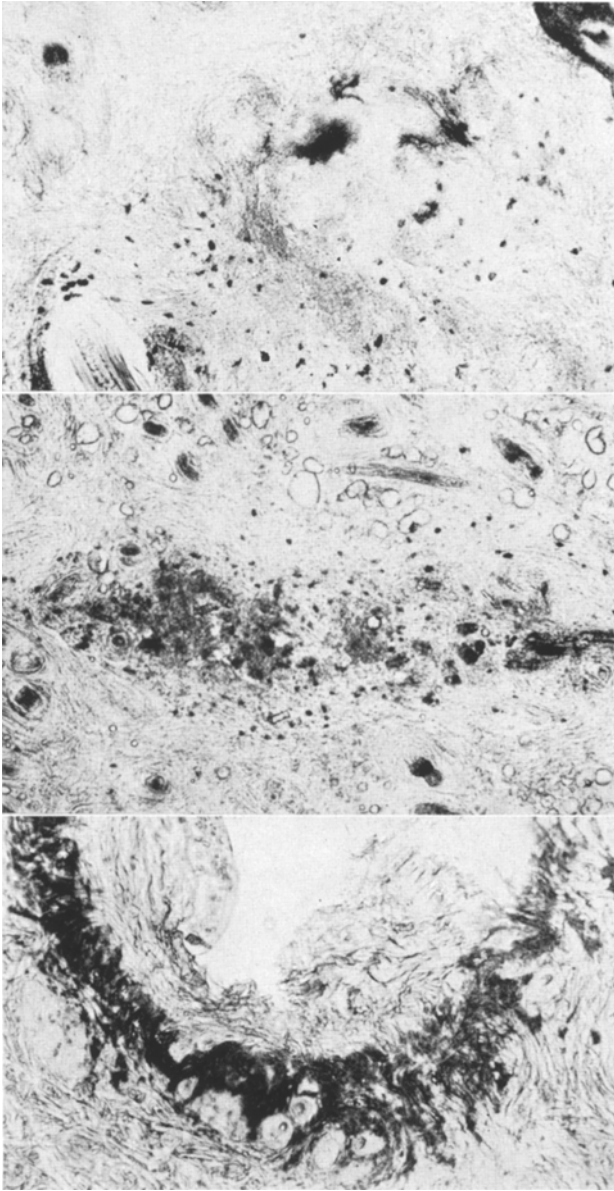


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3

Abb. 1. Alkalische Phosphatase 16 Std nach Kanüleneinstich. Die eine Hälfte des stark reagierenden Fibroblastenringes der äußeren Zone dargestellt. 90 ×

Abb. 2. Alkalische Phosphatase 32 Std nach Kanüleneinstich. Restaktivitäten und locker verteilte, positiv reagierende Fibroblasten. 90 ×

Abb. 3. Alkalische Phosphatase 64 Std nach Kanüleneinstich. Praktisch nur noch vereinzelt auftretende, positive Fibroblasten. 90 ×

oberen Hautschichten noch eine sehr intensive Reaktion erfassen, die durch positiv reagierendes Granulationsgewebe und Fibroblasten zustande kommt (Abb. 5).

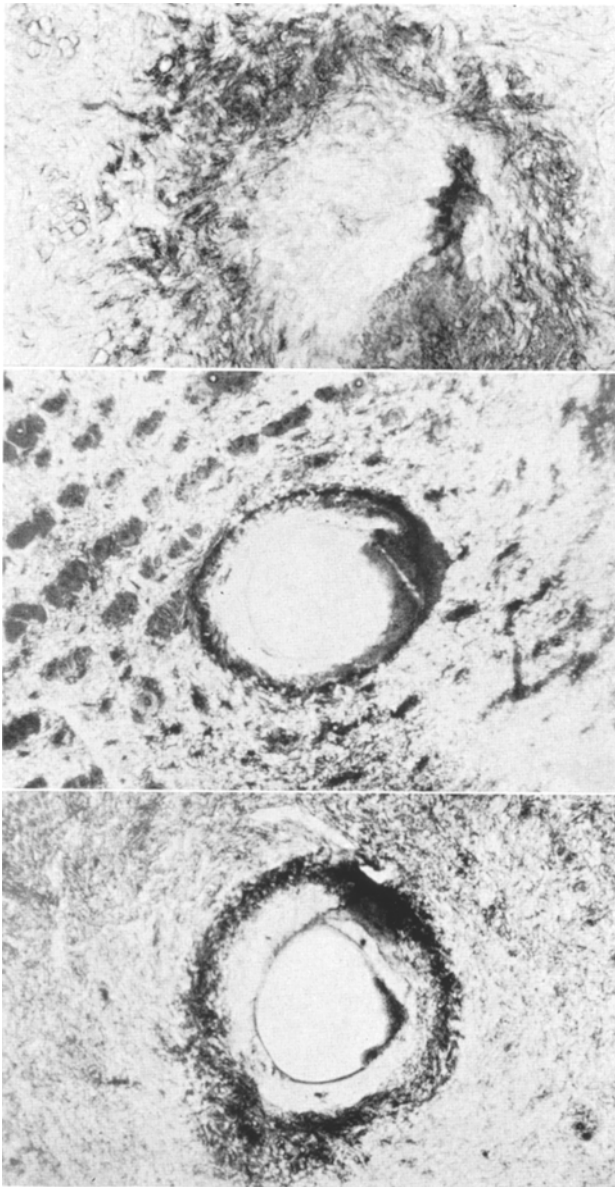


Abb. 4

Abb. 5

Abb. 6

Abb. 4. Naphthol-AS-Sulfatase 32 Std nach Kanüleneinstich. Starke Enzymreaktion im äußeren Fibroblastenring. 30×

Abb. 5. Saure Phosphatase 64 Std nach Kanüleneinstich. Stark entwickelte Reaktion im Fibroblastenring. 30×

Abb. 6. Unspezifische Esterase 16 Std nach Kanüleneinstich. Etwa Maximum der Reaktion in einer breiten Fibroblastenzone. 30×

Die unspezifische Esterase und die Adenosintriphosphatase sind in ihrem Verhalten ähnlich. Nach 2 bzw. 4 Std ist zunächst vorwiegend eine leukocytaire Reaktion, jedoch auch schon ein Ansatz zur Aktivitäts-

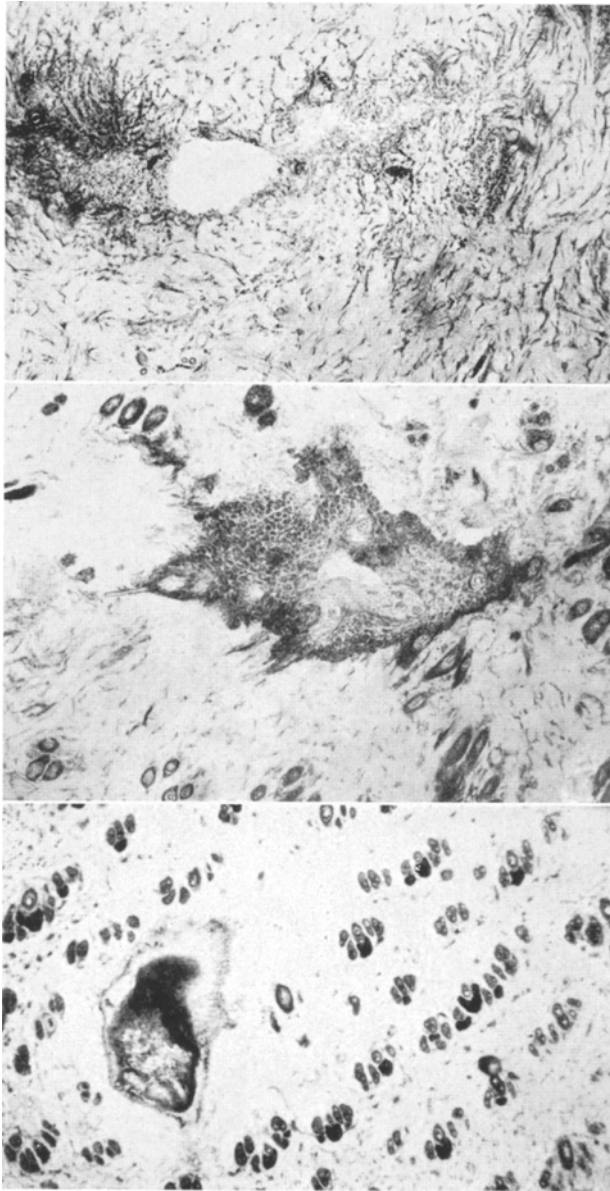


Abb. 7

Abb. 8

Abb. 9

Abb. 7. NAD-Oxidoreductase 64 Std nach Kanüleneinstich mit positiver Enzymreaktion um den Stichkanal. 20×

Abb. 8. Lactatdehydrogenase 64 Std nach Kanüleneinstich mit starker Reaktion der Epithelzellen. 30×

Abb. 9. Leucinaminopeptidase 4 Std nach Kanüleneinstich. Deutliche Ausbildung der Aktivität am Stichkanal. 30×

steigerung in der äußeren Zone vorhanden. Das Maximum liegt etwa bei 16—32 Std (Abb. 6) und sinkt dann langsam ab. Die starke Reaktion des Fibroblasten- und Fibrocytenringes ist besonders bei der Adenosin-

triphosphatase meist schon makroskopisch als weiter schwarzer Ring erkennbar.

Eine Aktivitätssteigerung der Bernsteinsäuredehydrogenase tritt sehr spät auf. Sie ist in Horizontalschnitten mit Sicherheit erst nach 32 Std direkt am Wundrand nachweisbar und zeigt sich im weiteren Verlauf wenig verändert.

Wesentlich wertvoller für die Altersbestimmung des Kanüleneinstiches sind das Auftreten der NAD-Oxidoreductase und der Lactat-Dehydrogenase. Nach dem Einstich tritt zunächst der in der inneren Zone auftretende Reaktionsabfall sehr deutlich zutage. Eine Verstärkung der Aktivität ist erst nach 16 Std nachweisbar mit einer weiteren Steigerung in den späteren Stadien. Der Stichkanal bzw. das regenerierende Gewebe wird durch die Enzymreaktion gut markiert (Abb. 7). Besonders intensiv lassen sich die Epithelzellen durch die Lactat-Dehydrogenase darstellen (Abb. 8).

Die L-Leucinaminopeptidase ist durch einen sehr gleichmäßig an- und absteigenden Aktivitätsverlauf charakterisiert. Das Maximum liegt etwa bei 16—32 Std. Der Beginn des Aktivitätsanstieges liegt zwischen 2 und 4 Std (Abb. 9).

Die Verteilung der Enzymaktivitäten ist im folgenden Schema noch einmal zusammengestellt:

Schema							
	2	4	8	16	32	64	128 Std
1. Alk. Phosph.	—	Leuko.+	++	+++	++	+	+—
2. AS-Sulf.	—	+	++	+++	++	+	—
3. Saure Phosph.	Leuko.	Leuko.	+	++	+++	+++	++
4. Esterase	Leuko.	Leuko.+	++	+++	+++	++	+
5. ATPase	—	Leuko.+	++	+++	++	+	—
6. Succinat D.	—	—	—	—	+	+	+
7. NAD-Oxid.	—	—	—	+	++	++	+
8. Lactat-D.	—	—	+	+	++	++	++
9. Aminopect.	—	+	++	+++	+++	++	+

Abnehmende Aktivitäten (innere Zone) wurden in der Tabelle nicht aufgeführt.

Die Kreuze geben den Aktivitätsgrad der Fibroblasten bzw. des umgebenden Gewebes an. Die Bezeichnung Leuko. deutet auf eine positive Leukocytenreaktion hin bzw. Leuko.+ auf eine Leukocyten- und schwache Fibroblastenreaktion.

Diskussion

Eine einfache, auf histologischen Methoden basierende Untersuchung von Injektioneinstichen ist uns nur von BOLZ [2] bekannt. Mit histochemischen Reaktionen lassen sich jedoch die zeitlichen Abstände auf

Grund der unterschiedlichen Enzymschwankungen relativ gut charakterisieren. Das 2-Stundenstadium zeichnet sich nur durch positive auswandernde Leukocyten aus, die mit dem Nachweis der unspezifischen Esterase und der sauren Phosphatase gut erfaßbar sind. Ein Aktivitätsanstieg der Aminopeptidase zu diesem Zeitpunkt, wie er von RAEKALLIO [7, 10, 11] angegeben wird, war nur gelegentlich nachweisbar und hat sicher Beziehung zur Größe der Wundsetzung.

Nach 4 Std beginnt der Aktivitätsanstieg der Aminopeptidase, der Adenosintriphosphatase, der alkalischen Phosphatase und der Esterase in den Fibroblasten der äußeren Zone.

Eine Abgrenzung gegen das 64-Stunden- und 128-Stundenstadium, in dem ähnliche, aber absinkende Aktivitäten zu verzeichnen sind, ist durch das Verhalten der sauren Phosphatase und der Dehydrogenasen möglich. Die saure Phosphatase (Substrat: Naphthol-AS-BS-Phosphat) gibt nach 4 Std eine ausgeprägte Leukocyten-, gegebenenfalls eine positive Wundrandreaktion. Erst nach 8—128 Std zeigen sich die stark reagierenden Fibroblastenringe um den Stichkanal, die für die späteren Wundheilungsstadien typisch sind.

Nach 8—16 Std steigen die Enzymaktivitäten weiter an. Die Differenzierung dieser beiden Zeitpunkte ist etwas schwierig, da sich auch der Nachweis der Dehydrogenasen in diesem Zeitpunkt nicht ganz sicher abgrenzen läßt.

Das 32-Stundenstadium ist durch das Verhalten der alkalischen Phosphatase charakterisiert. Während 8—16 Std nach dem Kanüleneinstich starke Aktivitäten in der äußeren Zone in dem typischen Fibroblastenring auftreten, erfolgt nach 16 Std ein steiler Abfall. Am Stichkanal sind dann nur noch unregelmäßige Anhäufungen positiver Zellen sichtbar, die im weiteren zeitlichen Verlauf immer weniger werden und nach 128 Std nur noch ganz vereinzelt auftreten bzw. ihre Aktivität verlieren.

64 Std nach dem Kanüleneinstich sind nur noch geringe Aktivitäten der Adenosintriphosphatase, der alkalischen Phosphatase und der Naphthol-AS-Sulfatase bei vergleichsweise hoher Aktivität der sauren Phosphatase, der Lactatdehydrogenase und der NAD-Oxidoreductase nachzuweisen.

Nach 128 Std, kurz vor der völligen Abheilung des Kanüleneinstiches, sinken die Aktivitäten der Enzyme weiter ab. Aber auch hier war in der oberen Hautzone noch die saure Phosphatase nachweisbar, während sich im Granulationsgewebe und im Epithel Lactat- und Succinatdehydrogenase erfassen ließen, ebenso wie die jetzt schon etwas abfallende NAD-Oxidoreductase. Die von ARGYRIS [1] beschriebenen hohen Aktivitäten der Bernsteinsäuredehydrogenase in den Basalschichten des bedeckenden Wundepithels haben wir an Horizontalschnitten nicht erfassen können.

Die Reproduktion der Ergebnisse war im allgemeinen gut, obwohl der erwähnte Fibroblastenring nicht immer so deutlich ausgeprägt war, wie ihn z.B. die Abbildungen zeigen. Auch zwischen den einzelnen zeitlichen Abstufungen gab es gelegentlich gewisse Überschneidungen, so daß für eine zeitliche Bestimmung eines Kanüleneinstiches doch gewisse Erfahrungen gefordert werden.

Kleine Unterschiede im Auftreten der Enzymaktivitäten gegenüber den Angaben RAEKALLIOS [11] lassen sich auf die Verwendung anderer Enzymsubstrate wie z.B. bei den Phosphatasen, auf andere Methoden wie bei dem Nachweis der Adenosintriphosphatase und auf die Größe der gesetzten Wunde zurückführen.

Zusammenfassung

Mittels histochemischer Methoden wird nach Kanüleneinstichen in die Rattenhaut das Aktivitätsverhalten einer Reihe von Enzymen untersucht. Durch die zeitlichen Verschiebungen der Maxima und die Aktivitätsunterschiede von 9 Enzymen ist eine relativ genaue Aussage über den Zeitpunkt des Kanüleneinstiches möglich.

Summary

Activity of a series of enzymes is examined by means of histochemical methods following syringe injections into rat skin. On the basis of temporal changes of the maxima and activity differences of nine enzymes a relative reliable statement regarding the time of the syringe injection becomes possible.

Literatur

- [1] ARGYRIS, T. S.: Succinic-dehydrogenase and esterase activities of mous skin during regeneration and fetal development. *Anat. Rec.* **126**, 1—14 (1956).
- [2] BOLZ, W.: Histologische Untersuchungen an Injektionsstichspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **40**, 188—191 (1951).
- [3] BURSTONE, M. S.: Histochemical comparison of naphthol-AS-phosphates for the demonstration of phosphatasen. *J. nat. Cancer Inst.* **20**, 601 (1958).
- [4] LINDNER, J.: Die Morphologie der Wundheilung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **301**, 39—70 (1962).
- [5] — Zur Diskussion der Wundheilung anhand neuer Befunde. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **4**, 118—169 (1964).
- [6] PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*. London: Churchill, L. TD. 1961.
- [7] RAEKALLIO, J.: Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing. *Nature (Lond.)* **188**, 234—235 (1960).
- [8] — Histochemical studies on vital and post-mortem skin wounds. *Ann. Med. exp. Fenn.* **39**, Suppl. **6**, 1—105 (1961).
- [9] LEVONEN E.: The appearance of esterases in rat skin wounds. *Ann. Med. exp. Fenn.* **41**, 305—310 (1963).

- [10] LEVONEN, E.: Histochemie des heilenden Bindegewebes. *Acta histochem.* (Jena), Suppl. **4**, 106—117 (1964).
- [11] — Histochemical demonstration of enzymatic response to injury in experimental skin wounds. *Exp. molec. Path.* **4**, 303—310 (1965).
- [12] SHNITKA, T. K., u. A. M. SELIGMAN: Role of esteratic inhibition on localization of esterase and the simultaneous cytochemical demonstration of inhibitor sensitive and resistant enzyme species. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 504—527 (1961).
- [13] WOOHSMAN, H., W. HARTRODT: Der Nachweis einer phosphatempfindlichen Sulfatase mit Naphthol-AS-Sulfaten. *Histochemie* **4**, 336—344 (1964).

Dr. L. FRIEBEL
Institut für gerichtliche Medizin
der Humboldt-Universität
X 104 Berlin, Hannoversche Straße 6

Dr. H. WOOHSMANN
Institut für cortico-viscerale-Therapie
und Pathologie der Deutschen Akademie
der Wissenschaften
X 1115 Berlin-Buch, Wiltbergstr. 50