

Die Anwendung der Leucinaminopeptidase-isozyme in der Schwangerschaftsdiagnostik aus Blutspuren

M. OYA und M. ASANO

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Nagoya (Japan)

Eingegangen am 10. April 1971

Application of Leucine Aminopeptidase Isozymes to the Diagnosis of Pregnancy from Blood Stains

Summary. Application of LAP-isozymes to the diagnosis of pregnancy from blood stains is described. Electrophoresis shows an LAP-active band in α_2 -globulin in extracts of blood stains of pregnant women in the latter half of pregnancy, puerperal women and in blood stains obtained at delivery. This method is recommendable for the examination of blood stains in medio-legal practice.

Zusammenfassung. Es wird über die Anwendungsmöglichkeit der LAP-isozyme in der Schwangerschaftsdiagnostik aus Blutspuren beschrieben. Aus den Blutspurenextrakten von Frauen in der letzten Hälfte der Schwangerschaft und Wöchnerinnen sowie Geburtsblutspurenextrakten läßt sich in der Elektrophorese eine LAP-aktive Bande im α_2 -Globulin-Bereich nachweisen. Diese Methode kann für Blutspurenuntersuchungen in der gerichtlichen Praxis empfohlen werden.

Key-Words: Schwangerschaftsdiagnostik — Leucinaminopeptidase-isozym — Spurenuntersuchung — Blutspuren.

In der gerichtsmedizinischen Praxis ergibt sich gelegentlich die Notwendigkeit anhand einer Blutspur eine Schwangerschaft zu diagnostizieren: Wurde z. B. eine schwangere Frau getötet, so gilt der Schwangerschaftsnachweis aus Blutspuren an Kleidungsstücken, Waffen oder anderen Gegenständen eines Verdächtigen als ein gewichtiger Hinweis auf den Täter. Außerdem ist bei Kindstötung- oder Abtreibungsfällen eine Differenzierung zwischen Geburts- und Abortusblutspuren erforderlich.

Zur Zeit werden folgende Methoden zur Bestimmung der Schwangerschaft aus Blutspuren angewandt [1].

1. Bestimmung der Vermehrung der Diaminoxidaseaktivität.
2. Bestimmung der Vermehrung des Kupfergehaltes.
3. Nachweis von Chorionzellen oder Fruchtwasserbestandteilen.
4. Positive biologische Schwangerschaftsreaktion.
5. Positive immunologische Schwangerschaftsreaktion.

Von diesen werden besonders die Reaktionen nach Aschheim-Zondek und Friedmann, die in der Geburtshilfe zur Diagnose der Frühschwangerschaft benutzt werden, seit längerer Zeit für gerichtsmedizinische Spurenuntersuchungen herangezogen [2, 3]. Neuerdings hat die Einführung der Methode des immunologischen

Choriongonadotropinnachweises auf der Grundlage der Agglutinations-Hemmreaktion an Blutfleckenmaterial wesentliche Fortschritte erbracht [4, 5].

Leucinaminopeptidase (LAP) wird häufig in klinischen Untersuchungen zur Organdiagnose verwendet, weil bei manchen Krankheiten ihre Aktivität zunimmt [6], und weil sie sich in der Elektrophorese in charakteristischen Banden auftrennen läßt, denen die aus den jeweiligen Organen in die Blutbahn freigesetzte LAP entspricht [7, 8]. Ferner tritt in den Seren von Frauen in der letzten Hälfte der Schwangerschaft LAP auf, die sich mit Hilfe der Elektrophorese von der LAP in Seren nicht schwangerer Frauen unterscheiden läßt [8]. In dieser Arbeit wird über die Möglichkeit berichtet, durch die Charakterisierung der Isoenzyme der LAP in Blutspuren eine Schwangerschaft nachzuweisen.

Material und Methoden

a) Seren

Seren von Frauen in jedem Monat der Schwangerschaft, Seren von Wöchnerinnen und Seren von nicht schwangeren Personen.

b) Blutspuren

1. Blutspuren von Frauen in jedem Monat der Schwangerschaft, Blutspuren von Wöchnerinnen und Blutspuren von nicht schwangeren Personen.

2. Geburtsblutspuren und Abortusblutspuren (beim Abortus im 2.—5. Monat).

3. Blutspuren von Frauen im 6., 8. und 10. Monat der Schwangerschaft, Blutspuren von nicht schwangeren Personen und Geburtsblutspuren, die je 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 30 und 60 Tage bei Zimmertemperatur gelagert wurden.

Diese auf Filterpapier aufgetragenen 3—4 cm² Blutflecke wurden mit einer Schere fein zerschnitten und in einem Reagenzglas mit 0,5 ml dest. Wasser eingeweicht. Dann wurde das Blut durch Verrühren mit einem Glasstab extrahiert.

c) Elektrophorese und Enzymnachweis

Die Elektrophorese wurde durchgeführt nach der von Meade und Rosalki angegebenen Methode [8], die wir in einigen Details modifizierten: Seren und Blutspurenextrakte (5—10 µl) auf Celluloseacetatmembranen (Oxoid) in 0,06 M Veronalpuffer (pH 8,6) bei konstantem Strom von 0,5 mA/cm für 90 min trennen. Nach Beendigung der Elektrophorese die Oxoidmembran auf Filterpapier legen, das mit einem 1:1-Gemisch von 0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8) und L-Lencin- β -naphthylamid-Lösung (0,8 mg/ml) getränkt worden ist und bei 37° C für 60 min inkubiert. Danach die Oxoidmembran in Fast Garnet G. B. C.-Lösung (1 mg/ml) für 15 min inkubieren.

d) Proteinfärbung

Dasselbe Material wurde ferner auf Oxoidmembranen unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Danach wurden die Proteine mit 0,4% Ponceau 3R in 3% Trichloracetat für 10 sec angefärbt und mit 5% Essigsäure überschüssiger Farbstoff ausgewaschen.

Ergebnisse

LAP-aktive Komponenten lassen sich auf Celluloseacetatstreifen als rosarote Banden darstellen. Durch Vergleiche ihrer Laufstrecken mit denen der Serumproteine kamen wir zu folgenden Ergebnissen: In Seren von Nichtschwangeren und Schwangeren bis zum 5. Monat befand sich eine schwache LAP-aktive Bande in der Mitte zwischen α_1 -Globulin und α_2 -Globulin. In Seren von Schwangeren

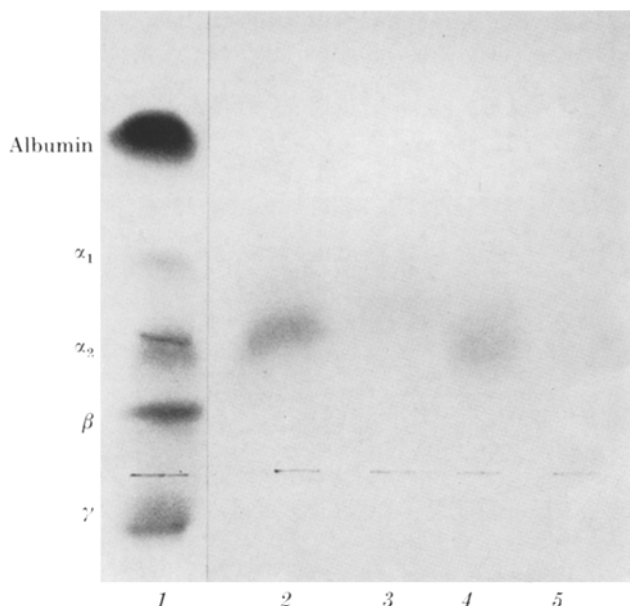


Abb. 1. Elektrophoretisch getrennte LAP-isozyme an Blutspuren verschiedenen Alters (1 Proteinfärbung; 2—5 Enzymfärbung). 1 Serumprotein; 2 3 Tage alte Blutspur einer Schwangeren im 10. Monat; 3 3 Tage alte Blutspur einer Nichtschwangeren; 4 14 Tage alte Geburtsblutspur; 5 10 Tage alte Abortusblutspur (Blutung beim Abortus im 3. Monat)

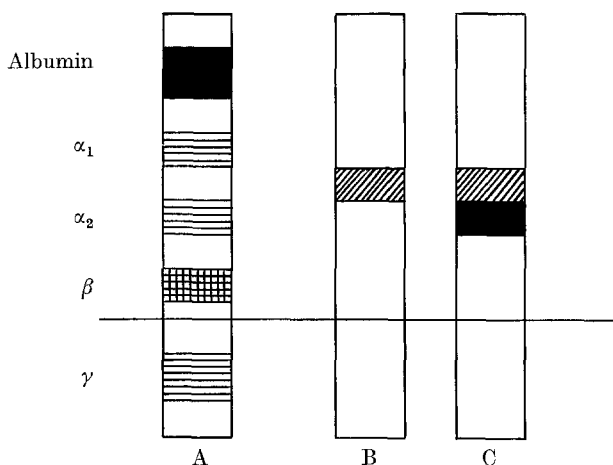


Abb. 2 A—C. Schematische Darstellung der LAP-isozyme. A Serumprotein. B Blutspuren der Nichtschwangeren, Blutspuren der Schwangeren bis zum 5. Monat und Abortusblutspuren. C Blutspuren der Schwangeren vom 6. Monat ab, Blutspuren der Wöchnerinnen und Geburtsblutspuren

vom 6. Monat ab und von Wöchnerinnen zeigte sich daneben zusätzlich noch eine langsamer wandernde Bande, die in ihrer Laufgeschwindigkeit dem α_2 -Globulin entsprach. Je mehr die Schwangerschaft fortschritt, um so stärker färbte sich diese

dem α_2 -Globulin entsprechende Bande. Vergleiche mit den Serumkontrollen ergaben, daß die korrespondierenden Blutspurenextrakte gleiche Wanderungsgeschwindigkeiten besaßen. Die dem α_2 -Globulin entsprechende Bande wurde auch in Geburtsblutspuren nachgewiesen, aber in Abortusblutspuren nicht (Abb. 1 und 2).

Wir untersuchten Seren und Blutspuren von 41 Personen, 7 Geburtsblutspuren und 6 Abortusblutspuren. Über die durchgeführten Untersuchungsergebnisse gibt nachfolgende Tabelle Auskunft. In gealterten Blutspuren von Schwangeren im 6. Monat war diese Bande noch 5 Tage, im 8. Monat 10 Tage, im 10. Monat 14 Tage und in Geburtsblutspuren 30 Tage lang nachweisbar.

Tabelle

Art der Blutspuren	Anzahl der Fälle	Anzahl der Nachweise
Nichtschwangeren	7	0
Schwangeren im		
1. Monat	0	0
2. Monat	1	0
3. Monat	3	0
4. Monat	3	0
5. Monat	2	0
6. Monat	5	3
7. Monat	3	2
8. Monat	5	5
9. Monat	2	2
10. Monat	6	6
Wöchnerinnen	4	4
Geburtsblutspuren	7	7
Abortusblutspuren	6	0

Diskussion

Meade und Rosalki [8] beobachteten in den normalen Nichtschwangerenserum eine LAP-aktive Bande im α_1 -Globulin und in den Seren von Schwangeren am Ende der Schwangerschaft eine Bande im α_2 -Globulin. Dagegen haben wir in jenen eine Bande zwischen α_1 -Globulin und α_2 -Globulin gefunden. Die beiden wurden in der Elektrophorese auf Celluloseacetatmembranen nur unvollständig voneinander getrennt.

Da die Bande im α_2 -Globulin nur in Schwangerenserum sowie in Placentaextrakten, nicht in Extrakten anderer Organe nachgewiesen werden konnte [8], scheint sie das placenta-spezifische LAP-isozym zu sein, welches aus der wachsenden Placenta ins Mutterblut übergeht. Das unter der Geburt und nach Ausstoßung der Placenta aus dem mütterlichen Genitale austretende Blut stammt von der A. uterina, es ist deshalb verständlich, daß auch in Geburtsblutspuren die LAP-aktive Bande im α_2 -Globulin nachweisbar ist. Bei Abortusblutspuren

ist der Nachweis nicht möglich, da im Anfang der Schwangerschaft die Placenta noch nicht hinreichend entwickelt ist, um die nötige Menge LAP zu produzieren.

Diese Methode ist besonders für die Durchführung forensischer Blutspurenuntersuchungen geeignet, weil sie methodisch einfach ist und an veralteten Blutspuren auch noch nach 5—30 Tagen den Schwangerschaftsnachweis erlaubt.

Literatur

1. Schleyer, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung, S. 103. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966.
2. Goroncy, C.: Untersuchung von Blutflecken mit der Aschheim-Zondekschen Reaktion. Dtsch. med. Wschr. **58**, 662 (1932).
3. Berg, S.: Der Nachweis von Geburts- und Abortusblut bei der Untersuchung von Spuren. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **39**, 199 (1948/49).
4. Abelli, G., Viterbo, B., Falagario, M.: The immunological diagnosis of pregnancy with specimen of blood stains. Med. Sci. Law **4**, 115 (1964).
5. Göring, H. D., Radzuweit, H.: Die Anwendung des Gravinum-Testes in der forensischen Schwangerschaftsdiagnostik aus Blut- und Urinspuren. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **62**, 32 (1968).
6. Lewis, J.: Serum leucine aminopeptidase values in patients with trophoblastic tumors and in normal pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynec. **84**, 1407 (1962).
7. Smith, E. E., Rutenburg, A. M.: Electrophoretic behaviour of an aminopeptidase of human tissues and serum. Nature (Lond.) **197**, 800 (1963).
8. Meade, B. W., Rosalki, S. B.: Localization of leucine aminopeptidase isoenzymes. J. clin. Path. **17**, 61 (1964).

Dr. med. M. Oya
Doz. Dr. med. M. Asano
Institut für gerichtliche Medizin
der Universität Nagoya
Showa-ku, Tsurumai-cho 65
Nagoya, Japan