

Geschlechtsbestimmung aus Blutspuren* **

EBERHARD SCHWINGER

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn (BRD)

Eingegangen am 15. November 1971

Sex Determination in Blood Traces

Summary. The sex determination by means of fluorescence microscopy in lymphocytes and leucocytes of dry small blood stains from various materials (cloth, glass, metal) is described. Even in 30-days-old samples the sex determination is unequivocal.

Zusammenfassung. Die fluoreszenzmikroskopische Methode einer Geschlechtsdiagnostik an Lymphocyten und Leukozyten eingetrockneter Blutspuren wird beschrieben. Innerhalb von 30 Tagen nach Entstehen einer Blutspur lässt sich mit Sicherheit sagen, ob der Verursacher dieser Spur ein Mann oder eine Frau gewesen ist.

Key words: Geschlechtsbestimmung — Geschlechtsdiagnostik — Spurenkunde, Geschlechtsbestimmung.

Caspersson (1970) hatte mitgeteilt, daß mit Fluorochromen angefärbte Chromosomen spezifische Anfär bemuster zeigen und diese Muster zur Chromosomenidentifizierung genutzt werden können. Vor allem das Y-Chromosom zeigt im distalen Drittel seines langen Armes eine sehr starke Anfärbbbarkeit.

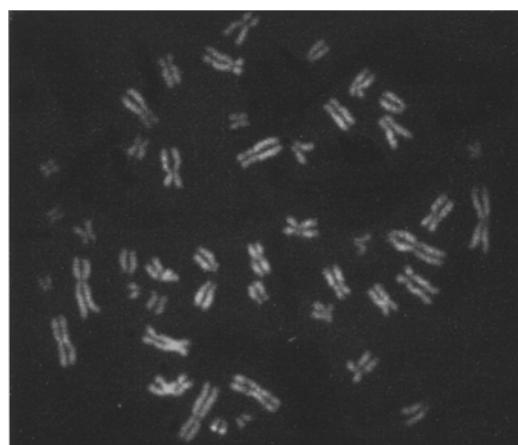


Abb. 1. Mitose mit stark fluoreszierendem Y-Chromosom am unteren Bildrand nach Färbung mit 0,5%iger wäßriger Lösung von Quinaerin-dihydrochlorid (Vergrößerung ca. 3000fach)

* Auszugsweise vorgetragen auf der 50. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Köln, Oktober 1971.

** Mit dankenswerter Unterstützung des Landesamtes für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen.

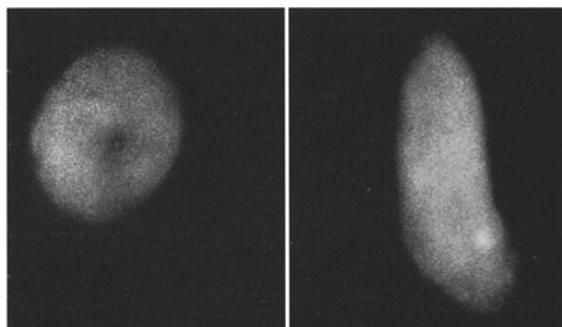


Abb. 2. Haarwurzelzellen links ohne Fluoreszenzkörperchen (weiblich), rechts mit randständigem Fluoreszenzkörperchen (männlich). Färbung: 0,5%ige wäßrige Lösung von Quinacrin-dihydrochlorid (Vergrößerung ca. 3000fach)

Diese selektive starke Anfärbung des Y-Chromosoms hat zur Folge, daß sich auch im Interphasekern, vor allem in Zellen mit aufgelockerter Struktur des Zellkerns, das Heterochromatin des Y-Chromosoms als fluoreszierender, stark leuchtender Punkt von ca. 2—5 μ Durchmesser deutlich sichtbar gegenüber dem autosomalen, auch angefärbten Chromatin abhebt. In Zellen weiblicher Individuen findet sich kein Fluoreszenzkörperchen.

Diese Färbemethode hat sich schnell als Ergänzung der Barr-Körperchen-Methode in der Geschlechtsdiagnostik durchgesetzt. War mit der Bestimmung des Barr-Körperchens, dieses entspricht dem Heterochromatin des 2. X-Chromosoms der Frau, bisher nur die positive Bestimmung des weiblichen Geschlechts möglich, ist nunmehr durch Feststellung des Fluoreszenzkörperchens in Zellen männlicher Individuen auch der positive Nachweis des Y-Chromosoms und damit des männlichen Geschlechts im Interphasekern möglich. Da vor allem in pyknotischem oder älterem Zellmaterial durch Chromatinbröckelchen ein Barr-Körperchen vorgetäuscht werden konnte, diese Fragen sind ausführlich bei Helmer (1970) diskutiert, ist die Sicherheit der Geschlechtsbestimmung an Zellmaterial durch gleichzeitige Verwendung beider Methoden, der Barr-Körperchen- und der Fluoreszenzkörperchen-Bestimmung, wesentlich erhöht worden.

Als Zellmaterial zur Geschlechtsbestimmung beim Lebenden eignen sich vor allem die Zellen der äußeren Haarwurzelscheide (Engel et al.; Schwinger et al.; François et al.; Goday et al.), welche leicht zu gewinnen sind, sowie Blutzellen des peripheren Blutes (Polani et al.; Mende et al.; Conen et al.; Müller et al.; Thuline; Lamborot-Manzur et al.) oder Wangenschleimhautabstriche (Pearson et al.; Majewski et al.). In Haarwurzelzellen ist das Fluoreszenzkörperchen besonders gut sichtbar zu machen, da die Zellstruktur dieser Zellen insgesamt locker ist.

Blutspuren entzogen sich bei Verwendung der Barr-Methode der Geschlechtsdiagnostik, da nur Granulocyten des peripheren Blutes in 1—5% die sog. „drumsticks“ als weibliches Merkmal aufweisen (Hienz). Lymphocyten zeigen kein Barrbody oder ein drumstick. Da Granulocyten in Blutspuren selten sind und dazu auch häufig deformiert vorliegen, konnte aus Blutspuren bisher keine sichere Geschlechtsdiagnose des Verursachers dieser Blutspur erreicht werden.

Um zu prüfen, ob die Methode der Fluoreszenzanfärbung von Interphasezellen auch zur Geschlechtsbestimmung an Blutspuren angewendet werden kann, wurden von uns folgende Untersuchungen durchgeführt:

Material und Methode

1. Von 5 männlichen und 5 weiblichen Probanden wurde Blut auf Objektträger und Leinenstoff aufgetropft. Diese Spurenträger wurden bei Zimmertemperaturen und Lichtexposition gelagert. Im Abstand von 1 Woche wurde jeweils im Blindversuch bei allen 5 männlichen und 5 weiblichen Probanden eine Blutspur von Glas und Stoff aufgearbeitet. Es sollte in diesem Teil des Versuches geprüft werden, wie lange die Geschlechtsdiagnostik an Blutspuren auf diesen Blatträgern nach Fluoreszenzanfärbung durchgeführt werden kann.

2. Blut wurde auf verchromtes, lackiertes und blankes Metall, Holz, synthetische und Wollstoffe aufgebracht. Nach einer Woche wurde geprüft, ob mit Abkratzen durch ein Skalpell genügend Zellmaterial auch von diesen Spurenträgern auf einen Objektträger gebracht werden kann, um daran eine sichere Geschlechtsdiagnose durchführen zu können.

Im Abstand von je 1 Woche wurde im ersten Teil des Versuches die Glas- und Stoffblutspur aufgearbeitet. Dazu wurde die Spur auf dem Glasobjektträger mit 25%iger Essigsäure überschichtet, so daß sich der Blutrest leicht von seiner Unterlage ablösen ließ. Weiße Blutzellen bleiben dabei auf dem Glas haften. Die Stoffprobe wurde auf einen Objektträger gelegt und mit einem feinen Skalpell fest über die Blutspur gekratzt, so daß sich Zellmaterial auf die Oberfläche des Objektträgers durchdrückte. Dann wurde dieser Objektträger vorsichtig angedaut, um später störende Stoffreste zu entfernen. Danach ebenfalls Fixation mit 25%iger Essigsäure. So vorbereitete Objektträger wurden in 0,5%iger wäßriger Lösung von Quinacrin-Dihydrochlorid (Bezugsnachweis: Dr. Bender & Dr. Hobein AG, Zürich 6; Edward Gurr Ltd., London, S.W. 14) für ca. 10 min gefärbt und anschließend in stehendem Leitungswasser für ca. 6 min gewässert. Nach dem Eindecken mit Phosphatpuffer pH 7,0 wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop durchmustert. Wir benutzten ein Zeiss-Universalauflichtfluoreszenzmikroskop. Die Verwendung eines Auflichtfluoreszenzmikroskops ist wegen des vor allem in älterem Spurenmaterial nur sehr schwach fluoreszierenden Y-Körperchens dringend notwendig, ebenso wie das Arbeiten im abgedunkelten Raum. Als Filterkombination findet jeweils ein Erregerfilter BG 12 (5 mm) und ein Sperrfilter 530 Verwendung. Filmmaterial: Kodac Tri X, Belichtungszeit: 10 sec.

Zur Geschlechtsdiagnostik aus Zellen des peripheren Blutes eignen sich vor allem Lymphocyten, in denen das Fluoreszenzkörperchen relativ gut sichtbar ist. Wir haben bei den Glasproben jeweils mindestens 50 und bei den Stoffproben jeweils mindestens 25 Lymphocyten beurteilt.

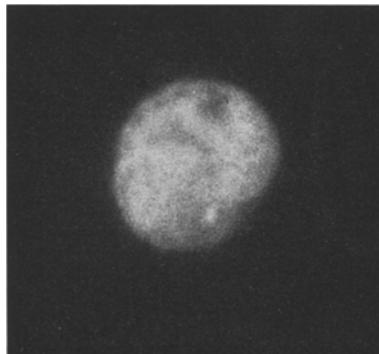


Abb. 3. Weiße Blutzelle aus 30 Tage alter eingetrockneter Blutspur mit Fluoreszenzkörperchen (männlich). Färbung: 0,5%ige wäßrige Lösung von Quinacrin-dihydrochlorid (Vergrößerung ca. 3000fach)

Ergebnisse

Innerhalb des 1. Monats nach Aufbringen der Blutspuren auf Glas und Stoff wurde in den wöchentlichen Untersuchungen keine falsche Geschlechtsdiagnostik gestellt. Der Prozentsatz der fluoreszenzpositiven Zellen war bei den Männern in der Stoff- und Glasprobe zwischen 20 und 30%, bei Frauen fluoreszenzkörperchenähnliche Gebilde unter 5%. In den 31 Tage alten Glasspuren und den 34 Tage alten Stoffproben wurde erstmals im Untersuchungsmaterial eines männlichen Individuums kein Fluoreszenzkörperchen gefunden, so daß eine falsche Geschlechtsdiagnose gestellt wurde. Auf den Glasspurenträgern war vom 45. Tag an überhaupt keine Geschlechtsdiagnose mehr durchführbar, da die Häufigkeit des Fluoreszenzkörperchens in Zellen männlicher Individuen nur noch 5% betrug und außerdem die Erythrocyten mit zunehmendem Alter eine störende grünliche Fluoreszenz aufwiesen, die eine sichere Beurteilung der weißen Blutzellen erschwerte. An den Stoffproben war eine Geschlechtsdiagnostik noch länger möglich. An den 64 Tage alten Stoffproben wurde noch an allen 10 Fällen die richtige Geschlechtsdiagnose gestellt, die Häufigkeit des Fluoreszenzkörperchens bei Zellen männlicher Individuen lag bei 20%. Danach kam es auch hier gehäuft zu Fehldiagnosen.

Das im zweiten Teil des Versuches getestete Überbringen von Spurenmaterial von den obenerwähnten anderen Spurenträgern brachte in allen Fällen ausreichende Mengen an Zellmaterial, um eine sichere Geschlechtsdiagnose durchführen zu können. Dabei wurden jeweils mit einem feinen Skalpell Blutreste von den Spurenträgern abgekratzt und auf einen Objektträger gebracht, der dann in der obenbeschriebenen Weise weiterbehandelt wurde.

Diskussion

Eine Aussage über das Geschlecht des Verursachers einer eingetrockneten Blutspur ist an weißen Blutzellen für den geübten Beobachter innerhalb von 30 Tagen mit der obengeschilderten Methode mit großer Sicherheit möglich. Die Untersuchung geht schnell und ist billig. Voraussetzung für solche Untersuchungen ist die Verwendung eines Auflichtfluoreszenzmikroskops und das Arbeiten im abgedunkelten Raum. Am besten eignen sich für eine Geschlechtsdiagnose Lymphocyten.

Die Methode einer Geschlechtsdiagnostik an Blutspuren ist neu und erscheint für die forensische Medizin und Spurenkunde wichtig. Mit der bisher angewandten Barr-Körperchen-Bestimmung konnte in Spuren von Epithel-, nicht aber von Blutzellen eine Geschlechtsdiagnostik durchgeführt werden, da in Blutzellen nur in 1—5% „Barr-Körperchen“ (sog. drumsticks) in Granulocyten als weibliche Merkmale nachweisbar sind (Tolksdorf; Hienz). In anderen Blutzellen finden sich keine Barr-Körperchen. Granulocyten sind aber in Blutspuren selten und werden durch notwendige präparatorische Schritte leicht so deformiert, daß eine Beurteilung der drumsticks unmöglich ist.

Die Darstellung des Y-Fluoreszenzkörperchens in weißen Blutzellen ist wegen der guten Haltbarkeit und der Häufigkeit dieser Zellen in Blutspuren relativ einfach. Auch ist die Differenz zwischen den Häufigkeiten fluoreszenzkörperchenpositiver Zellen bei Frauen mit maximal 5% und Männern mit über 20% groß

genug, um auch bei dem Vorhandensein von Artefakten eine sichere Unterscheidung treffen zu können. Das typische Fluoreszenzkörperchen ist in Lymphocyten meist randständig lokalisiert und von sichelförmiger Gestalt.

Bei den in weiblichen Zellen sehr selten auftretenden fluoreszierenden Y-Körperchen-ähnlichen Strukturen handelt es sich vorwiegend um stark fluorescierendes autosomales Heterochromatin oder um Artefakte wie Fettröpfchen sowie Glasverunreinigungen der Objektträger.

Mit zunehmendem Alter der Blutspuren nimmt die Häufigkeit des Fluoreszenzkörperchens in Zellen männlicher Individuen ab. In frischen Blautausstrichen von Männern sind 50—70% der Lymphocyten und Granulocyten fluoreszenzkörperchenpositiv (Polani et al.; Mende et al.; Conen et al.; Müller et al.; Thuline; Lamorot-Manzur et al.), während bei unseren Untersuchungen in 30 Tage alten Blutspuren nur noch 20—30% Lymphocyten männlicher Individuen fluoreszenzpositiv waren und dieser Prozentsatz mit zunehmendem Alter der Blutspur weiter absank. Für diese Abnahme gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder lösen sich mit zunehmendem Alter der Zellen post mortem Chromatinstrukturen auf, oder die spezifische Anfärbung des Y-Chromosoms geht bei erhaltenem Heterochromatin verloren.

Müller untersuchte bis zu 36 Tage alte Blutspuren von 20 männlichen und 11 weiblichen Individuen, ebenfalls ohne eine falsche Geschlechtsdiagnose zu stellen.

Innerhalb 1 Monats, einem für polizeiliche Ermittlungen recht langen Zeitraum, sind die obenerwähnten Zellveränderungen noch so gering, daß die Sicherheit der Geschlechtsbestimmung nicht eingeschränkt ist. Dennoch sollte beachtet werden, daß eine Geschlechtsdiagnose an Blutzellen so schnell als möglich durchgeführt werden sollte.

Fräulein F. von Wartenberg danke ich sehr herzlich für die wertvolle technische Mithilfe.

Literatur

- Caspersson, T., Lomakka, G., Zech, L.: The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability. *Hereditas* (Lund) **67**, 89—102 (1971).
- Conen, R. E., Lewin, P. K., Vakil, D. V.: Rapid Y chromosome identification in human blood smears. *Canad. med. Ass. J.* **104**, 925—926 (1971).
- Engel, E., Moore, K., McGee, B. J., Engel, M. L.: Fluorescent male sex chromatin in hair root cells. *Sth. med. J. (Bgham, Ala.)* **64**, 161—162 (1971).
- François, J., Matton-van-Leuven, M. Th., Acosta, J.: Male and female sex determination in hair roots. *Clin. Genet.* **2**, 73—77 (1971).
- Goday, C., Egozcueuy, J., Bafall, E.: Sex-chromatin fluorescence in hair-root cells. *Lancet* **1971 II**, 220.
- Helmer, R.: Möglichkeiten und Methoden der zellkernmorphologischen Geschlechtserkennung an Körnergeweben und Sekret-Spuren. Lübeck: Schmidt-Römhild 1970.
- Hienz, H.: Die Beziehungen zwischen zellkernmorphologischem und chromosomenmorphologischem Befund. *Z. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre* **37**, 378—394 (1963).
- Lamborot-Manzur, M., Tishler, P. V., Atkins, L.: Fluorescent drumsticks in male polymorphs. *Lancet* **1971 I**, 973—974.
- Majewski, F., Bier, L., Pfeiffer, R. A.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen durch Acridinderivate („Atebrin“, „Acralin“). *Klin. Wschr.* **49**, 814—818 (1971).

- Mende, S., Alonso, A.: Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts in menschlichen Blutzellen. Dtsch. med. Wschr. **96**, 1122—1127 (1971).
- Müller, Hj., Voegelin, M. G., Bühler, E. M., Stalder, G. R.: Erfahrungen mit der fluoreszenzmikroskopischen Erfassung des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen verschiedener Gewebe. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. (Im Druck.)
- Müller, Hj., Bühler, E. M., Voegelin, M. G., Stalder, G. R.: Eine neue Methode der Geschlechtsbestimmung in Leukozyten aus eingetrockneten Blutflecken. Schweiz. med. Wschr. **101**, 1171—1174 (1971).
- Pearson, P. L., Borrow, M., Vosa, C. G.: Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. Nature (Lond.) **226**, 78—80 (1970).
- Polani, P. E., Mutton, D. E.: Y-fluorescence of interphase nuclei, especially circulating lymphocytes. Brit. med. J. **1971 I**, 138—142.
- Schwinger, E., Rakebrand, E., Müller, Hj., Bühler, E. M., Tettenborn, U.: Y-body in hair roots. Humangenetik **12**, 79—80 (1971).
- Thuline, H. C.: Y-specific fluorescence in peripheral blood leukocytes. J. Pediat. **78**, 875—876 (1971).
- Tolksdorf, M.: Sexchromatin-Diagnostik mit Hilfe des Leukozytentests. In: Schwarzacher, H. G., Wolf, U., Methoden in der medizinischen Cytogenetik. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.

Dr. med. E. Schwinger
Institut für Gerichtliche Medizin
D-5300 Bonn, Stiftsplatz 12
Deutschland