

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin in Innsbruck (Vorstand: Prof. Dr. F. J. HOLZER) und aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie (Vorstand: Prof. Dr. v. D. WENSE)

Zur mikroskopischen Geschlechtsbestimmung an Leichenteilen*

Von

FRANZ-JOSEF HOLZER und EVE MARBERGER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Dezember 1956)

Die mikroskopische Bestimmung des Geschlechtes an Körperzellen nach MOORE und BARR^{13, 14, 15, 1, 9} wurde an Lebenden weitgehend erprobt und bestätigt. An den Epithelkernen des Wangenschleimhautausstriches^{11, 17} und den Leukocyten im Blutausstrich^{4, 8, 22} wurde das Geschlechtschromatin untersucht und auch an Tumorzellen gelang TAVARES²³, MOORE und BARR¹⁶ der Geschlechtsnachweis. Aus Zellen der durch Punktion Schwangerer gewonnenen Amnionflüssigkeit haben SHETTLES²¹, SERR, SACHS und DANON²⁰ das Geschlecht der Frucht bestimmt. Über die klinische Anwendung^{12, 18} der Methode und zur Untersuchung von Zwittern und Fällen von Gonadenagenesie und -dysgenesie liegen schon reichlich Erfahrungen vor^{2, 24, 3, 19, 5, 7}.

Während über die morphologische Geschlechtsbestimmung an Zellkernen des Lebenden zahlreiche Arbeiten mit verschiedensten Problemstellungen vorliegen, wurde die Anwendbarkeit des Testes in der forensischen Medizin unseres Wissens kaum untersucht.

EMERY und McMILLAN⁶ untersuchten erstmals auch Hautstückchen von Leichen 55 neugeborener Kinder und 10 Leichen Erwachsener. Die Proben waren bis zu 6 Tage nach dem Tode entnommen worden.

Technik: Formolfixierung, Färbung der Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin. In 80% ließ sich das Geschlecht bestimmen.

Für die gerichtliche Medizin hat die Geschlechtsbestimmung an Körperzellen in mehrfacher Hinsicht Bedeutung. Man denke nur an die Schwierigkeiten, die sich dem gerichtlichen Mediziner bei Untersuchung von Teilen zerstückelter Leichen entgegenstellen können. So wurde seinerzeit von einem in der Donau gefundenen Bein das Geschlecht nicht erkannt. Aus der Haut oder aus einzelnen Körper- oder Organzellen die Diagnose zu stellen, ob Mann oder Frau, wäre ein großer Fortschritt.

* Mit Unterstützung der Ciba Company, N.J., USA. — Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin, Oktober 1956 in Marburg.

Wir haben uns deshalb zur Aufgabe gemacht, die Brauchbarkeit der Methode auf unserem Gebiet zu prüfen und dabei auch den Einfluß der Leichenveränderungen, vor allem der Fäulnis als Störung zu untersuchen.

Von Leichen wurden Hautstückchen ausgeschnitten, fixiert und histologisch untersucht. Dem Ort der Entnahme kommt keine wesentliche Bedeutung zu, wie frühere Untersuchungen von MARBERGER¹⁰ ergeben haben.

Bezüglich der Technik sei gleich erwähnt, daß die Formalinfixierung und Hämatoxylin-Eosinfärbung insofern keine voll befriedigenden Resultate ergaben, als bei schlecht erhaltenem Gewebe irreführende Befunde auftreten können. Es sei hier auf die Erfahrungen von MARBERGER* an formolfixierten Stücken von Tumoren hingewiesen, bei denen es mitunter nicht möglich war, genau das Geschlecht festzustellen, da die Kerne durch Formalinfixierung schrumpften. Deshalb haben wir die Fixierung in Davidson-Lösung und die Nuclealfärbung nach FEULGEN für Paraffinschnitte bevorzugt.

1. Fixierung

Das Gewebstück wird unmittelbar nach der Entnahme in eine modifizierte Davidson-Lösung gelegt, nach 24stündiger Fixierung in 70%igen Alkohol übertragen und darin unter mehrmaligem Wechsel 24—48 Std belassen. Die Davidson-Lösung hat sich als besonders geeignetes Konservierungsmittel der Kernstruktur erwiesen. Sie besteht aus 20 Teilen 40%igem Formalin, 30 Teilen 96%igem Alkohol, 10 Teilen Eisessig und 30 Teilen destilliertem Wasser.

Das entsprechend fixierte Gewebe wird im normalen Paraffinverfahren eingebettet und in 5-Mikronstärke geschnitten.

Als Färbemethode hat sich eine modifizierte Feulgen-Technik bewährt.

Nuclealfärbung nach FEULGEN

Feulgen-Technik für Paraffinschnitte (STOWELL, R. E. STAIN, Techn. 20: 45—56, 1945).

Salzsäure: 10 cm³ konz. Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 mit dest. Wasser auf 100 cm³ auffüllen.

Fuchsinchwefelige Säure: 0,5 g basisches Fuchsin mit 100 cm³ kochendem dest. Wasser lösen. Öfters umschütteln. Nach Abkühlung auf etwa 50° C filtrieren, mit 10 cm³ n-HCl und 1 g Natriumbisulfat versetzen. Schütteln und in einer mit Schliffstopfen versehenen Gasflasche mindestens 24 Std im Dunkeln stehen lassen. 0,25 g neutrale Tierkohle hinzufügen, 7 min schütteln und schnell filtrieren. Das klare Filtrat wird im Eisschrank aufbewahrt und hält sich ungefähr 14 Tage.

Bleichen in SO₂-haltigem Wasser: 200 cm³ dest. Wasser, 10 cm³ 10% wäßriges Natriumbisulfid, 10 cm³ n-HCl.

1. Die mit Eiweiß-Glycerin aufgeklebten 4—5 μ dicken Schnitte kommen nach Entparaffinieren aus destilliertem Wasser zur Hydrolyse in n-Salzsäure in einen auf 60° C eingestellten Wärmeschrank (20 min).

2. Unterbrechen der Hydrolyse durch kurzes Auswaschen in kalter n-Salzsäure.

* MARBERGER-BRADBURY, unveröffentlichte Ergebnisse.

3. Einstellen der Präparate in fuchsinschwefeliger Säure für 2 Std.
4. Auswaschen in SO₂-haltigem Wasser; 3mal 10 min.
5. Auswaschen in Brunnenwasser 5 min und dest. Wasser 5 min (nach dem Wässern evtl. schwache Gegenfärbung mit 0,05% Lichtgrün). Steigender Alkohol, Xylol, Balsam.

Unter Ölimmersion werden die Kerne der Epidermis auf ihren Geschlechtschromatingehalt untersucht und gezählt.

Die Zählung soll mindestens 100 der besterhaltenen, zufällig in das Blickfeld gerückten Kerne umfassen.

Befunde

Den als Geschlechtschromatin bezeichneten, mit Hämatoxylin sich intensiv färbenden und feulgenpositiven Kernkörper findet man in einer typischen Lage und Größe in Randstellung in ungefähr $\frac{2}{3}$ aller weiblichen Epidermiskerne (Abb. 1 und 2).

Mit einiger Übung ist das Geschlechtschromatin als eine plankonvexe Masse in halber Größe des Nucleolus, an die Kernmembran geschmiegt, leicht festzustellen.

Kerne der männlichen Haut zeigen wesentlich seltener, in weniger als 15% Chromatinpartikelchen, die dem Geschlechtschromatin der weiblichen Zelle in Größe und Lage gleichkommen.

Um die Methode möglichst objektiv zu prüfen, wurden die Fläschchen mit den Gewebstücken nur mit Nummern versehen, ohne Geschlecht, Alter usw. dem Untersucher bekanntzugeben, die Zellkerne in den Schnitten auf ihren Gehalt an typischen, membranahen Chromatin-körpern — das Geschlechtschromatin — ausgetestet und aus den geschlechtschromatinreichen Kernen auf das weibliche, bzw. aus den chromatinarmen auf das männliche Geschlecht geschlossen und in eine Liste eingetragen.

Beim späteren Vergleich stellte sich heraus, daß die Geschlechtsbestimmung nach der Kernmorphologie bei 78 Leichen einwandfrei möglich war und das Untersuchungsergebnis sich mit den Protokollangaben deckte. In 2 Fällen war die Geschlechtsbestimmung wegen starker Kernschrumpfung unmöglich.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die mikroskopische Geschlechtsbestimmung an normaler Haut oder Zellen der Wangenschleimhaut auch von ungeübten Untersuchern vorgenommen werden kann, während dieselbe Untersuchung an schlecht fixiertem oder postmortal verändertem Gewebe beträchtliche Erfahrung voraussetzt. Einer von uns (MARBERGER) hatte Gelegenheit, die Methode in den USA an einem großen Material zu erlernen und weiter zu entwickeln.

Unsere Untersuchungen betrafen Leichen von Menschen verschiedenen Alters und Geschlechtes, Früchte von 35 cm Länge bis zu Greisen von 83 Jahren. Auch waren die verschiedensten Todesarten vertreten,

ohne daß dieselben irgendeinen Einfluß auf die Befunde gehabt hätten. An sich ist nach unseren bisherigen Erfahrungen aus Hautstücken frischer Leichen und Leichen mit gut erhaltener Kernfärbbarkeit das Geschlecht geradezu mit Sicherheit zu bestimmen. Die seit dem Tode

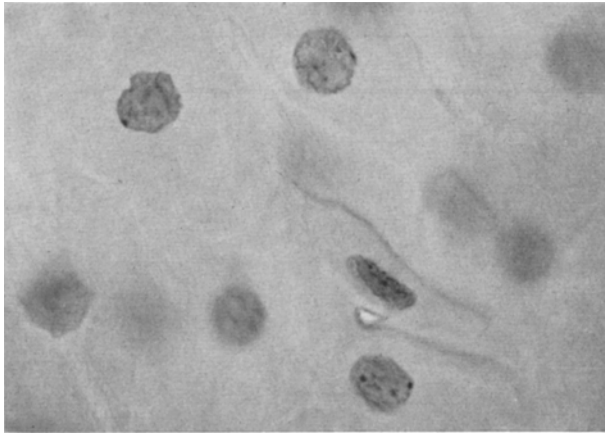


Abb. 1. Epithelkerne der Mundschleimhaut mit Geschlechtschromatin (weiblich)

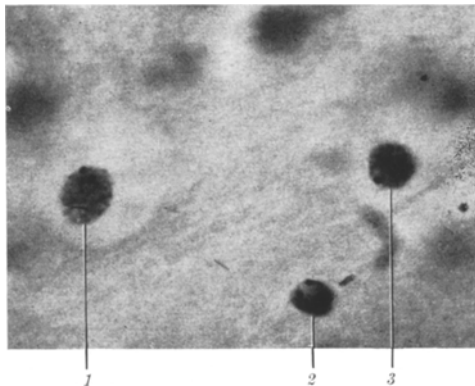


Abb. 2. Hirnrinde einer weiblichen Leiche. In den Kernen 1—3 die kernmembrannahen, feulgenpositiv gefärbten Chromatinkörper (Geschlechtschromatin)

bis zur Entnahme der Hautstückchen eingetretene Zeit schwankt von wenigen Stunden bis zu $1\frac{1}{2}$ Monaten.

Unsere Untersuchungen bezogen sich nicht nur auf Haut, sondern vielfach auch auf verschiedene andere Organe.

Es eignen sich besonders chromatinarme Gewebe, z. B. Muskulatur, sowohl glatte wie quergestreifte und Herzmuskulatur, Bindegewebszellen, Histiocyten und Fibroblasten, Nervenzellen, Parenchymzellen der Leber,

Niere und Nebenniere, so daß bei Leichenteilen auch die verschiedensten Gewebe herangezogen werden können.

Tabelle 2 zeigt die Verhältniszahl der Kerne mit Geschlechtschromatin in verschiedenen Geweben von 20 Leichen.

Tabelle 1

Untersuchungs- material	Ge- schlecht	Anzahl	Prozent-Kerne mit Geschlechtschromatin
Hautbiopsien von Lebenden	♀	25	51—82
	♂	50	1—15
Hautstücke von Leichen	♀	29	54—88
	♂	49	1—14

Das Wesentliche dieser Tabelle ist das Fehlen von Überschneidungen und daß kein Unterschied zwischen den Befunden an Lebenden und Leichen besteht (vgl. Tabelle 1 a).

Wie bei den Untersuchungen der Hautstückchen zeigen sich auch an den Organzellen fast die gleichen Verhältniszahlen geschlechtschromatinhaltiger Kerne, bei männlichen Leichen schwankt die Prozentzahl von 0—14, bei weiblichen Leichen zwischen 45 und 88%.

Tabelle 1 a

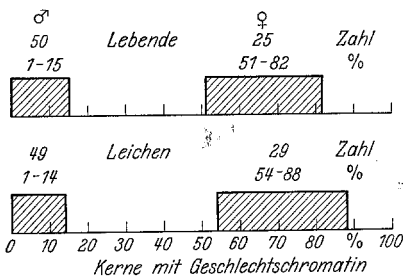


Tabelle 2 a

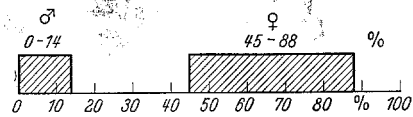


Tabelle 2. Prozent Kerne mit Geschlechtschromatin in verschiedenen Geweben (20 Leichen)

Gewebe	(14) ♂	(6) ♀
Niere (Tubuliepithel)	2—14	50—58
Leber (Leberzellen)	0—12	45—72
Lunge (Bindegewebe und Epithelzellen)	4—10	60—63
Muskel (quergestreifte Muskelzellen)	2—7	64—71
Großhirnrinde (Pyramidenzellen)	5—9	56—88

Wie die schematische Darstellung Tabelle 2 a zeigt, liegen auch hier die Befunde für weibliche und männliche Zellen ohne Überschneidungen deutlich getrennt.

An einer alten Fettwachsleiche war allerdings kein Ergebnis mehr zu erzielen, da keine Kerne mehr zu erkennen waren. Bei 3 Leichen, die

nach $1\frac{1}{2}$ Monaten aus der Lawine geborgen wurden, war die Bestimmung noch einwandfrei möglich.

Zur speziellen Frage der Dauer der Nachweisbarkeit wird Kollege SCHLEYER berichten (erscheint im Zbl. Path.).

Anwendung

Die Untersuchungen von Spuren aus tiefergelegenen Geweben könnten bei Verkehrsunfällen, wenn am Fahrzeug Gewebsteile mit Bindegewebe oder Muskulatur kleben, zum Nachweis, ob diese Teilchen von einem männlichen oder weiblichen Individuum stammen, von Wichtigkeit sein. Auch in Gewebsresten an Werkzeugen nach Gewalttaten kann die Geschlechtsdiagnose von Bedeutung sein. Allerdings stört dabei die Eintrocknung und Schrumpfung, wie in laufenden Versuchen noch geprüft wird.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit der Barrschen Methode zur Geschlechtsbestimmung ist die Untersuchung von Menstrualblutflecken mit dem Nachweis von Scheidenzellen. Wenn auch die Glykogenreaktion der Zellen einen wichtigen Hinweis gibt, wäre der Nachweis des weiblichen Geschlechtsschromatins eine wertvolle, die Diagnose weiter sichernde Ergänzung. Wir haben erst kürzlich diese Methode in einem Fall herangezogen.

Technik: Der Fleck wird auf dem Wäschestück mit Wasser aufgeweicht, die Macerationsflüssigkeit ausgedrückt, wie bei der Untersuchung von Speichelabstrichen auf Objektträgern verrieben und noch feucht 2—12 Std in die Davidson-Fixierungsflüssigkeit getaucht, der Objektträger dann nach FEULGEN gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Ein anderes Gebiet praktischer Verwertbarkeit des Verfahrens ist die Unterscheidung von Fleischarten oder Gewebsteilen bei Untersuchungen wegen Wilddiebstahls zur Klärung der Frage, ob gefundenes Fleisch oder eine sichergestellte Wilddecke von einer Geiß oder einem Rehbock herrührt, was nach dem Jagdrecht von praktischer Bedeutung sein kann.

Auch bei Viehdiebstahl können solche Untersuchungen von Nutzen sein, wenn es gilt — wie uns praktisch solche Fragen gestellt wurden — nachzuweisen, ob vorgefundenes Schafffleisch von einem Mutterschaf oder Widder herrührt.

In anderer kriminalistischer Beziehung kommt der Geschlechtsschromatinnachweis an Briefmarken und Klebestellen von Briefen (anonymer Briefschreiber) in Betracht, um zu prüfen, von wem der Speichel stammt.

Serologisch wurden die Blutgruppensubstanzen des Speichels an Briefmarken und gummierten Briefumschlägen schon wiederholt zur Klärung herangezogen. Es wäre ein weiterer Fortschritt, wenn es gelingen würde,

an solchen Briefmarken und Klebestellen Zellen der Mundschleimhaut, Zunge und Lippen festzustellen und am Geschlechtschromatin dieser Zellen das Geschlecht des Absenders zu bestimmen. In dieser Richtung sind Versuche im Gange, gestatten aber noch keine endgültige Beurteilung. Auch von der Mundschleimhaut und aus dem Speichel stammende Zellen an Zahnstochern könnten gelegentlich von kriminalistischer Bedeutung sein.

Bekanntlich ist der Geschlechtsnachweis an Abstrichen aus der Mundschleimhaut an sich ohne weiteres möglich. Untersuchungen an Speichel- und Nasensekretflecken sind im Gang.

Noch bedeutungsvoller erschiene uns, an Zigarettenstummeln das Geschlecht der Raucher zu ermitteln und damit einen Hinweis zu erhalten, wer am Tatort geraucht hat, ob z. B. als Abtreiber ein Mann oder eine Frau in Betracht kommt.

An Mundstücken von Zigaretten lassen sich nach unseren bisherigen Erfahrungen reichlich Zellen nachweisen, es gelingt vor allem, diese Zellen mit Cellophanklebestreifen vom Zigarettenmundstück abzulösen. Ob diese Zellen eine Geschlechtsdiagnose ermöglichen, müssen laufende Untersuchungen erst zeigen. Wir weisen auf sie hin und würden es begrüßen, wenn die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode auch von anderen Untersuchern kritisch überprüft würden.

Zusammenfassung

Die forensisch wichtige Bestimmung des Geschlechtes aus dem Geschlechtschromatin der Hautkerne nach BARR wurde an 80 Leichen untersucht und war bei noch entsprechend erhaltenen Kernen ausnahmslos möglich. Bei männlichen Leichen fand sich das Geschlechtschromatin in 0—15%, bei weiblichen in 45—88% der Kerne. Auch an Organzellen 20 untersuchter Leichen wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

Auf noch laufende Untersuchungen zur Anwendung der Methode an Fleisch, Weichteilresten, an Werkzeugen und Fahrzeugen, Harn, Speichel und Nasensekret, Menstrualblutflecken, an aufgeklebten Briefmarken, Zigarettenstummeln und Zahnstochern auf Herkunft der Zellen von Mann oder Frau wird hingewiesen.

Literatur

- ¹BARR, M. L.: The skin biopsy test of chromosomal sex in clinical practice. *Anat. Rec.* **121** (1955). — ²BARR, M. L.: The sex chromatin and its application to errors in sex development. *Mod. Trends in Obst. and Gyn.* 2nd ser., chapt. 7. London: Butterworth & Co. LTD. — ³BOHLE, A., u. H. A. HIENZ: Zellkernmorphologische Geschlechtsbestimmung an der Placenta. *Klin. Wschr.* **1956**, Nr 35/36. — ⁴DAVIDSON, W. M., and D. R. SMITH: Morphological sex differences in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Brit. Med. J.* **1954**, 6. — ⁵EHRENGUT, W.:

Das Chromosomengeschlecht bei Gonadenmangel und die Differenzierung der Geschlechtsorgane. *Z. Kinderheilk.* **77**, 322 (1955). — EMERY, J. L., and M. McMILLAN: Observations on the female sex chromatin in human epidermis and on the value of skin biopsy in determining sex. *J. of Path.* **68**, 1, 17 (1954). — ⁷HOLZER, F. J.: Diskussionsbemerkung. *Refl. Wien. klin. Wschr.* **1956**, Nr 27, 563. — ⁸KOSENOW, M., u. R. SCUPIN: Geschlechtsbestimmung auf Grund morphologischer Leukocytenmerkmale. *Klin. Wschr.* **1956**, 51. — ⁹MARBERGER, E., and W. O. NELSON: Sexual differences in epidermal nuclei of human skin. *Anat. Rec.* **118**, 399 (1954). — ¹⁰MARBERGER, E., u. W. O. NELSON: Geschlechtsbestimmung in der menschlichen Haut. *Brun's Beitr.* **190**, 1 (1955). — ¹¹MARBERGER, E., R. A. BOCABELLA and W. O. NELSON: Oral amear as a method of chromosomal sex detection. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **89**, 498 (1955). — ¹²MARBERGER, E.: Bestimmung des genetischen Geschlechtes aus Körperzellen. *Wien. klin. Wschr.* **1956**, Nr 27, 563. — ¹³MOORE, K. L., M. A. GRAHAM and M. L. BARR: The detection of chromosomal sex in hermaphrodites from a skin biopsy. *Surg. etc.* **96**, 641 (1953). — ¹⁴MOORE, K. L., and M. L. BARR: Morphology of the nerve cell nucleus in mammals, with special reference to the sex chromatin. *J. Comp. Neur.* **98**, 2 (1953). — ¹⁵MOORE, K. L., u. M. L. BARR: Nuclear morphology, according to sex, in human tissues. *Acta anat. (Basel)* **21**, 197 (1954). — ¹⁶MOORE, K. L., and M. L. BARR: The sex chromatin in benign tumors and related conditions in man. *Brit. J. Canc.* **9**, 246 (1955). — ¹⁷MOORE, K. L., and M. L. BARR: Smears from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. *Lancet* **1955**, 57. — ¹⁸NIEMANN, M., M. PIERSON, B. PIERSON and J. DE WYN: Survey of sex differentiation: The new cytologic methods of determining genetic sex and their clinical applications. *Semaine Hôp.* **1956**, 1132. Ref. aus *J. Amer. Med. Assoc.*, July 1956. — ¹⁹NOELLE, H.: Untersuchungen über die geschlechtsspezifischen Morphologie des Zellkerns. *Ärztl. Wschr.* **1956**, 39. — ²⁰SERR, D. M., L. L. SACHS and M. DANON: The diagnosis of sex before birth using cells from the amniotic fluid. *Bull. Rex Coune. of Israel B* **5** (1955). — ²¹SHETTLES, L. B.: Sex of infant in relation to nuclear morphology of cells in human amniotic fluid. *Fed. Proceed.*, April 1956, Atlantic City, N.J. — ²²SUN, L. C. Y., and A. E. RAKOFF: Evaluation of peripheral blood smear test in detection of chromosomal sex in the human. *J. Clin. Endocrino, a. Metabolism* **16**, 1 (1956). — ²³TAVARES, A. S.: On the sex of cancer and teratoma cells. *Lancet* **1955**, 948. — ²⁴TOLKSDORF, M., H. ROMATOWSKI, M. SALLE u. H. R. WIEDEMANN: Über Geschlechtsbestimmung aus dem Blutbilde und deren Anwendung beim Hermaphroditismus. *Ärztl. Wschr.* **1955**, 45.

Prof. Dr. HOLZER und Dr. EVE MARBERGER, Innsbruck, Müllerstr. 44