

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Tottori
(Direktor: Prof. Dr. R. NANIKAWA)
und aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER)

Über das postmortale Verhalten der Succinodehydrogenase-Aktivität in Geweben und Leukocyten

Von

R. NANIKAWA U. W. JANSSEN

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. April 1964)

Die Erforschung der feineren Verteilung von Dehydrogenasen in Organen und Geweben beim Menschen und verschiedenen Säugetieren darf nach den grundlegenden Arbeiten von ROTENBURG et al., NEUMANN u. KOCH, PADYKULA, PEARSON im wesentlichen als abgeschlossen gelten. In den letzten Jahren konzentrierte sich das Interesse mehr auf die praktische Nutzenanwendung und die Verbesserung der Methodik. Zum histochemischen Nachweis spezifischer Dehydrogenasen wurden immer mehr Mono- und Ditetrazoliumsalze herangezogen, deren Verbindungen und Formazane unter Berücksichtigung ihrer Eindringungsfähigkeit, Lipoidunlöslichkeit und Kristallgröße vor allem eine genaue intracelluläre Lokalisation der Fermente ermöglichen sollten (WOHLRAB, dort Literatur). Sehr wahrscheinlich liegen diese im Bereich der Mitochondrien und haben eine Bedeutung für die Zellatmung. In neuerer Zeit wurde eine chemische Nachweismethode entwickelt, die auch eine quantitative Erfassung der Succinodehydrogenase (SDH)-Aktivität ermöglicht (NANIKAWA und TAWA). Allen Verfahren, die einen Nachweis der zu Lebzeiten bestehenden SDH-Aktivität zum Ziele haben, ist gemeinsam, daß sie von lebendfrisch gewonnenem Gewebematerial ausgehen müssen. Schon bald nach dem Tode kommt es nämlich, wie bei fast allen Fermenten, zu einer Änderung der SDH-Aktivität.

Diese Abweichungen vom Status des Lebenden, ihre Beziehungen zur postmortalen Zeit und ihre Beeinflußbarkeit durch verschiedene Milieufaktoren wurden, soweit wir das einschlägige Schrifttum übersehen, noch nicht systematisch untersucht. Es erschien uns deshalb angebracht, unsere nachfolgenden Beobachtungen als Beitrag zur Lehre von den Leichenveränderungen mitzuteilen.

Eigene Untersuchungen

a) Histochemisch

Der histochemische SDH-Nachweis im Gewebe erfolgte an Organ- und Gewebematerial von Ratten, Kaninchen und menschlicher Skelettmuskulatur. Verwendet

wurde die Methode von WACHSTEIN und MEISEL (1955). Das Inkubationsmedium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

5 ml Neotetrazoliumchlorid 0,2%
5 ml Natriumsuccinatlösung 0,1 m
5 ml Phosphat-Puffer (pH 7,6) m/15
3—4 Tropfen CaCl_2 0,33 m
2 ml Natriumbicarbonat 0,6 m
3 ml Aqua dest.

Zur Reaktion wurden native 20 μ dicke Gefrierschnitte, aufgenommen in physiologischer Kochsalzlösung, für 1½ Std bei 37° in obigem Medium inkubiert, danach Waschen der Schnitte in physiologischer Kochsalzlösung, Fixierung in 10%igem neutralem Formalin und Einschluß der Schnitte in Glyceringelatine. — Bei positivem Ausfall bilden sich nach Reduktion, wie bei allen Ditetrazoliumverbindungen, bekanntlich zwei Reaktionsprodukte.

Neben dem blauen, Alkohol- und Wasser-unlöslichen Diformazan entsteht bei unvollständiger Reduktion („half reduction“¹⁴, PEARSE 1960, BENEKE und SIMON) das rote, wasserunlösliche, aber alkohollösliche Monoformazan. Entsprechende Kontrollen ohne Substrat (5 ml Aqua dest. anstelle von Na.-Succinat) und mit verschiedenen Inhibitoren, wie Na.-malonat (3,7 g/ml), Na.-cyanid (0,125 g/ml), Na.-fluorid (1,05 g/ml) und Na.-jodacetat (0,15 g/ml) beweisen die Spezifität des SDH-Nachweises.

Die Auswertung der Reaktion bereitet gewisse Schwierigkeiten, da es sich hier, wie bei den meisten histochemischen Fermentlokalisationen um keine quantitative Methode handelt. Hinzukommt, daß es sehr schwierig ist, an inhomogenen Gewebsschnitten mit unterschiedlichen Gewebsstrukturen verschiedene Färbungsstufen auszuwerten. Unter voller Würdigung dieser Nachteile sind wir, wie NEUMANN und KOCH, dennoch der Ansicht, daß bei sorgfältiger Beachtung gleicher Reaktionsbedingungen aus der Farbintensität und der Menge des entstandenen Formazans ein gewisser Rückschluß auf die vorhandene SDH-Aktivität möglich ist. Eine wichtige Voraussetzung ist auch, daß die Bewertung der Farbreaktion in der Hand eines Untersuchers bleibt, um zusätzliche, subjektiv bedingte Variationen der Ergebnisse zu vermeiden. — Unter diesen Versuchsbedingungen wurde der Reaktionsausfall, bemessen nach der farblichen Qualität und nach der Dichte der gebildeten Granula und Kristalle, in sechs Abstufungen dargestellt: negativ —, rosarot +, hellrot ++, dunkelrot +++, rötlich-violett ++++ und blauviolett +++++.

Die Entnahme des Organmaterials erfolgte für die histochemische Untersuchung bei insgesamt 14 Ratten (5—7 Monate alt, 250—300 g schwer) und drei Kaninchen (ca. 1—2 Jahre alt, 3 kg schwer). Unmittelbar im Anschluß an die Tötung durch Genickschlag oder Luftembolie wurden zwei Ratten und ein Kaninchen sezirt und die Organe — Herz, Nieren, Leber und Skelettmuskulatur (M. quadriceps femoris) — sofort bearbeitet. Von einem Kaninchen wurde nach Entnahme einer kleinen Gewebprobe der größte Teil des Herzens bei 0° C im Kühlschränk aufgehoben. Die übrigen getöteten Tiere wurden unsezirt in luftdicht abschließenden Gefäßen bei einer Temperatur von 20° C gelagert; die Sektion erfolgte jeweils erst kurz vor der histochemischen Untersuchung.

Die sofortige Untersuchung nach der Tötung ergab eine unterschiedlich starke SDH-Aktivität der einzelnen Organe. Wie schon aus den Untersuchungen an lebensfrischen Geweben von NEUMANN und KOCH und aus älteren Mitteilungen bekannt ist, haben bereits normalerweise die Gewebe einen unterschiedlichen SDH-Gehalt. In Übereinstimmung damit fanden auch wir im Herzmuskel den stärksten Aktivitätsgrad in Form sehr dichter, intracytoplasmatisch gelegener, blauvioletter Kristalle oder Granula. Diese Feststellung galt sowohl für Ratten, als auch für Kaninchen. Die nächst schwächere Stufe der SDH-Aktivität fand sich im Nierengewebe, besonders in den distalen Tubuli und in der Skelettmuskulatur; am schwächsten war die Reaktion im Lebergewebe.

Zur Untersuchung der SDH-Aktivität nach dem Tode wurden in täglichen Abständen von jeweils zwei Ratten die Organe und Skelettmuskelteile entnommen und nach der vorstehend aufgeführten Methode untersucht. Bei den Kaninchen wurde zur Einsparung von Tiermaterial von jeweils einem Tier zweimal in eintägigen Abständen entnommen, ehe das nächste Tier seziiert wurde. Das Ergebnis der postmortalen

Tabelle 1. *Histochemisches Verhalten der SDH-Aktivität nach dem Tode bei 12 Ratten Lagerung bei 20° C*

| Postmortale Untersuchung | Stärke der SDH-Aktivität in | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-------|-------|---------------|
| | Herz | Niere | Leber | Skelettmuskel |
| sofort | +++++ | +++++ | ++ | +++ |
| 1. Tag | +++++ | +++++ | ++ | +++ |
| 2. Tag | ++++ | +++ | ++ | ++ |
| 3. Tag | +++ | ++ | + | ++ |
| 4. Tag | +++ | ++ | + | ++ |
| 5. Tag | +++ | + | + | + |
| 6. Tag | ++ | + | + | + |
| 7. Tag | + | ± | - | ± |

Tabelle 2. *Postmortale SDH-Aktivität (histochemisch) bei 3 Kaninchen. Lagerung bei 20° C*

| Postmortale Untersuchung | Stärke der SDH-Aktivität in | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-------|-------|---------------|
| | Herz | Niere | Leber | Skelettmuskel |
| sofort | +++++ | +++++ | ++ | +++ |
| 1. Tag | +++++ | +++ | + | +++ |
| 2. Tag | ++++ | +++ | + | ++ |
| 3. Tag | ++++ | ++ | + | ++ |
| 4. Tag | +++ | ++ | + | ++ |
| 5. Tag | +++ | + | ± | + |
| 6. Tag | ++ | + | ± | ± |
| 7. Tag | + | ± | - | - |

Untersuchung von den Ratten und Kaninchen ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

Die an mehreren Organ- und Schnittstellen durchgemusterten Präparate zeigten ein bemerkenswert gleichsinniges Verhalten der SDH-Aktivität. Nachdem sowohl bei Ratten als auch Kaninchen trotz bereits z.T. makroskopisch erkennbarer Autolyse und Fäulnis in den ersten beiden Tagen post mortem die Fermentreaktion in nahezu normaler Stärke ausfiel, d.h. kaum erkennbar nachließ, kam es zwischen dem

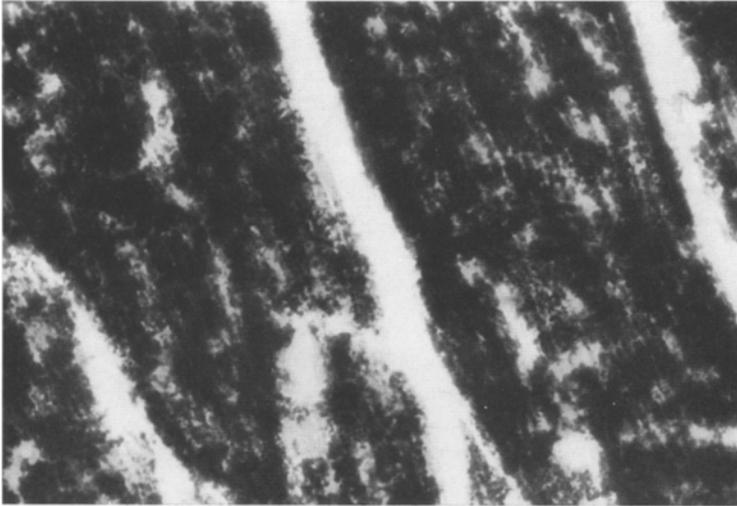


Abb. 1. Kaninchenherzmuskel. — Gleichmäßig starke SDH-Reaktion sofort nach der Tötung

3. und 4. Tag zu einem deutlichen Abfall der SDH-Aktivität. Dieser Rückgang äußerte sich vor allem in circumscribten, rötlichen Aufhellungen und Abblassungen der vorher stark positiven, blau-violetten Gewebspartien (Abb. 1—4). Gleichzeitig wurden die Formazangranula ausgesprochen feinkrümelig, und schließlich hatten die nur noch schwach positiv reagierenden Bezirke ein homogenes, hell- oder rosarotes Aussehen. Am stärksten war der Fermentabfall in der normalerweise schon weniger SDH enthaltenden Leber; hier war am 7. Tag keine Reaktion mehr nachzuweisen. Ähnlich, nur nicht so ausgeprägt, war der Rückgang in Nieren und Skelettmuskulatur. Am längsten hielt sich das Ferment im Herzmuskel, wo noch am 7. Tag nach der Tötung bei Ratten und Kaninchen eine deutlich positive Reaktion zu erkennen war. Eine weitere, über den 7. Tag hinausgehende Ausdehnung der Untersuchungen war wegen starken Madenbefalls der Tierleichen nicht mehr möglich.

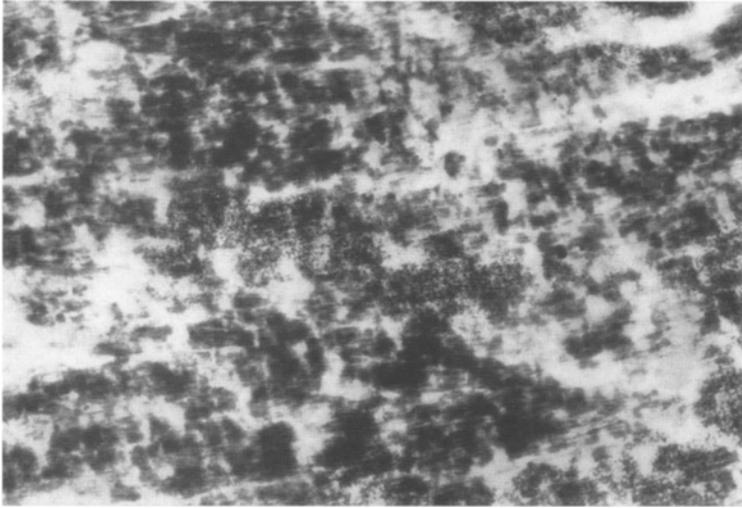


Abb. 2. Kaninchenherzmuskel 4 Tage nach der Tötung, bei 20° C gelagert. — Abblassung und fleckförmige Aufhellung der SDH-Reaktion

Im Kaninchenherzmuskel, der bei 0° C gelagert wurde, blieb die SDH-Aktivität wesentlich länger erhalten; das erste, geringe Nachlassen der Reaktion sahen wir am 7. Tag p.m., und selbst nach dem 10. Tag waren noch reichliche, dicht liegende, dunkelrote Granula vorhanden.

Tabelle 3. *Postmortales Verhalten der SDH-Aktivität in menschlicher SK-Muskulatur. Lagerung bei 20° C*

| Postmortale Untersuchung | SDH-Aktivität der menschlichen Skelettmuskel | | |
|--------------------------|--|---------|--------------|
| | Psoas | Oberarm | Oberschenkel |
| 1. Tag | +++ | ++ | ++ |
| 2. Tag | ++ | ++ | ++ |
| 3. Tag | ++ | ++ | ++ |
| 4. Tag | ++ | + | ++ |
| 5. Tag | ++ | + | + |
| 6. Tag | + | + | + |
| 7. Tag | + | + | + |
| 10. Tag | ± | ± | ± |
| 15. Tag | ± | — | — |

Zum Vergleich führten wir SDH-Reaktionen an menschlicher Skelettmuskulatur durch. Verwendet wurde möglichst fettfreies Muskelgewebe Leichen etwa vom Ileopectus, Oberarm und Oberschenkel, das von vier kühl gelagerten 24 Std nach dem Tode entnommen wurde. Es handelte sich um zwei Frauen und

zwei Männer im Alter von 40—55 Jahren. Das Gewebematerial wurde bei 20° C in verschlossenen Flaschen gelagert; die Untersuchungen erfolgten zuerst in eintägigen, später in mehrtägigen Abständen. — Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse, die keine individuellen Unterschiede erkennen ließen, zeigen ein ähnliches Verhalten der SDH-Aktivität wie bei den Tieren. Bis zum 7. Tag p.m. erfolgte ein zwar

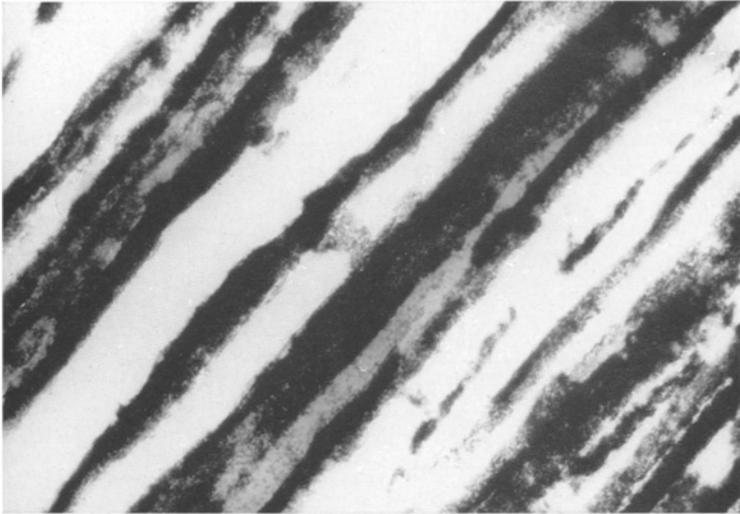


Abb. 3. Oberarmmuskulatur vom Menschen 6 Std p.m. mit gleichmäßig starker SDH-Reaktion

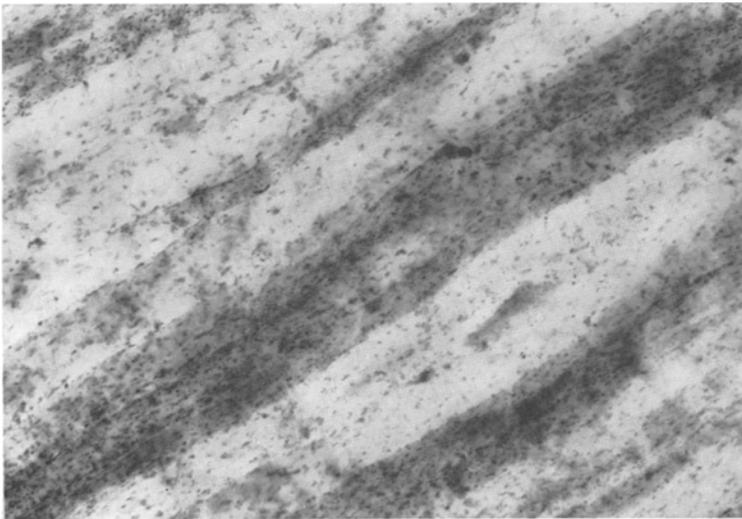


Abb. 4. Menschlicher Oberarmmuskel 4 Tage p.m. bei 20° C gelagert, mit starkem Schwund der SDH-Aktivität

langsameres, aber deutlich erkennbares Nachlassen der Reaktion, und am 10. Tag war sie noch fraglich positiv. Am 15. Tag fanden sich nur noch im Psoas und in der Oberarmmuskulatur Spuren einer schwach rosaroten Reaktion.

Von besonderem Interesse war das Verhalten der SDH-Aktivität in den *Leukocyten*, da es sich hier um ein verhältnismäßig leicht zugängliches Untersuchungsmaterial handelt. Verwendet wurde Blut von zwei Menschen und zwei Kaninchen, das kurz nach dem Tode entnommen und ohne Zusätze in Reagensgläsern mit Gummiverschlüssen bei 20 und 0° C gelagert wurde.

Die Reaktion erfolgte nach der Methode von MORRISON und KROHNHEIM (1962), die den Autoren zur SDH-Darstellung in Mäuseleukocyten an Tupfpräparaten aus der Milz diente. — Bei jeder Untersuchung fertigten wir je Fall vier Ausstriche auf Objektträgern an, 5—15 sec Fixierung bei 15° C in Formalin-CaCl₂, zweimal abspülen mit aqua dest. und Inkubation für 30 min bei 37° C in folgender Substratlösung: 17 ml 0,06 m Sörensen-Puffer (pH 7,4), 17 ml 0,2 m Natriumsuccinatlösung, 17 ml Nitro-BT (1 mg/ml) und 12,65 mg Natrium-Amytal.

Tabelle 4. SDH-Aktivität der Leukocyten von Menschen (bei 20° C) und Kaninchen (bei 0° C)

| Untersuchung nach dem Tode | SDH-Aktivität der Leukocyten | |
|----------------------------|------------------------------|----------------|
| | 20° C Menschen | 0° C Kaninchen |
| 0 | +++ | +++ |
| 1. Tag | +++ | +++ |
| 2. Tag | ++ | +++ |
| 3. Tag | ++ | +++ |
| 4. Tag | + | +++ |
| 5. Tag | + | +++ |
| 6. Tag | + | ++ |
| 7. Tag | + | ++ |
| 10. Tag | — | ++ |
| 12. Tag | — | + |
| 15. Tag | — | + |
| 20. Tag | — | ± |

Danach Kernfärbung mit 0,2%igem Methylgrün in Acetattuffer (pH 4,2). In 80—90% der Leukocyten war dann im Cytoplasma schon ohne Ölimmersion eine deutliche, bläulich-rote Granulierung zu erkennen. Durch entsprechende Inhibitoren ließ sich auch hier die Spezifität der Fermentlokalisation beweisen.

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse zeigen in Menschenleukocyten bei 20° C ein Nachlassen der SDH-Aktivität am 2. Tag p.m., eine rosarote Reaktion am 4. Tag und ein Negativwerden nach dem 7. Tag. In Kaninchenleukocyten, die einen gleichen Fermentgehalt aufweisen, blieb bei 0° C die SDH-Reaktion bis zum 6. Tag unverändert stark, bis zum 15. Tag fiel sie rosarot aus und wurde erst am 20. Tag fraglich positiv.

b) Chemisch¹

Durch Modifikation einer von GLOCK und JENSEN (1953) entwickelten Methode gelang es NANIKAWA und TAWA 1960 durch Messung des Reduktionsvorganges auch quantitative Aussagen über die Größe der SDH-Aktivität zu machen. Inzwischen hat sich das Verfahren bei verschiedenen Untersuchungen z. B. über das Verhalten der SDH-Aktivität im Herzmuskel bei experimenteller Kohlenmonoxydvergiftung (NANIKAWA, HAMAOKA und AWATA) bewährt. Die Methode umfaßt folgende Arbeitsgänge:

¹ Die Untersuchungen wurden im Institut für gerichtliche Medizin der Universität Tottori (Yonago, Japan) durchgeführt.

Ca. 100 mg lebensfrisch entnommenes Herzmuskelgewebe wird in einem Potter-Elvehjem Glashomogenisator mit Phosphatpuffer (pH 7,4) zu einer 10%igen Lösung verarbeitet. 1 ml des Homogenisates wird zusammen mit 1 ml 0,1 m Natriumsuccinat, 1 ml 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7,4) und 1 ml aqua dest. in dem Hauptröhrchen eines Thunberg Röhrchens deponiert. In den Seitenarm wird 1 ml 0,1%iges Neotetrazoliumchlorid eingebracht. Nach Evakuierung des Röhrchens bis zu einem Unterdruck von 10 mm Hg und Verschuß desselben erfolgt für 15 min Bebrütung bei 37° C. Anschließend Mischung des Inhaltes aus Haupt- und Seitenarm, wodurch die Reaktion in Gang gesetzt wird. Nach genau 30 min Beendigung der Reaktion durch Zusatz von 10 ml wassergesättigtem Äthylacetat und Schüttelung zur Mischung des gebildeten Diformazans, sowie Absaugen des überstehenden Äthylacetats mit Filterpapier. An dieser Extraktlösung und einer Kontrollösung (1 ml Aqua dest. anstelle von Na-succinat) wird die optische Dichte mit einem Elektrophotometer, Interferenzfilter von 530 m μ , gemessen. Die Ermittlung der SDH-Aktivität erfolgt an einer vorher hergestellten Standardkurve.

Die linear verlaufende Standardkurve ergibt sich aus Dichtemessungen an unterschiedlichen, in ihrem Ausgangsmaterial genau bekannten Diformazanlösungen. Zur Herstellung der Medien wurden steigende Mengen von Neotetrazoliumchlorid (10, 20, 30 μ g usw.) mit Hydrosulfit reduziert und in Äthylacetat gelöst. Die Aktivitätseinheit wird in μ g/mg/30 min ausgedrückt; d.h. eine bestimmte Menge Neotetrazoliumchlorid wird pro mg Gewebe bei 37° C innerhalb von 30 min reduziert. — Weitere Einzelheiten sind aus der englisch gefaßten Originalarbeit von NANIKAWA und TAWA zu entnehmen.

Tabelle 5. *Quantitative Bestimmung der normalen SDH-Aktivität im Herzmuskel von 11 Mäusen. Durchschnitt $4,41 \pm 0,58 \mu$ g/mg/30'*

| Ge- schlecht | Körper- gewicht g | Herz- gewicht mg | SDH-Aktivität μ g/mg/30 min |
|-----------------|-------------------------|------------------------|------------------------------------|
| ♂ + ♀ | 20,0 | 125 | 3,89 |
| | 19,0 | 100 | 4,04 |
| | 14,7 | 70 | 4,13 |
| | 18,1 | 80 | 4,30 |
| | 19,0 | 90 | 4,90 |
| | 17,9 | 80 | 5,12 |
| | 16,3 | 75 | 4,11 |
| | 17,5 | 100 | 5,70 |
| | 19,0 | 100 | 4,42 |
| | 19,0 | 80 | 4,20 |
| | 15,0 | 85 | 3,70 |

Für die hier vorliegende Mitteilung über das postmortale Verhalten der SDH-Aktivität wurden die Herzen von 72 weißen Mäusen untersucht. Zuvor erfolgte eine chemisch-quantitative Bestimmung der normalerweise im Herzmuskel vorhandenen Fermentaktivität bei elf Mäusen (Tabelle 5). Es fand sich ein Durchschnittswert von $4,41 \pm 0,58 \mu$ g/mg/30'. — Zur Bestimmung der postmortalen Aktivität wurden 28 getötete Mäuse bei 0° C, 24 bei 5—10° C und 20 bei 25° C in verschlossenen Glasgefäßen gelagert. Aus jeder Gruppe wurden zuerst in eintägigen, später in fünftägigen Abständen zwei Mäuse seziiert und deren Herzen nach der vorstehend geschilderten Methode bearbeitet. Die Mittelwerte von jeweils zwei Tieren wurden in eine Kurve übertragen, so daß sich für jede Gruppe das Verhalten der SDH-Aktivität an dem zugehörigen Kurvenbild ablesen ließ. Abb. 5 mit einer Gegenüberstellung der drei Kurven zeigt, daß eine Lagerung der getöteten Tiere bei 25° C schon nach 10 Tagen zu einem völligen Verschwinden

der SDH aus dem Herzmuskel führte. Bei 5–10° C verlief der Aktivitätsabfall wesentlich langsamer; er betrug 20 Tage p.m. etwa ein Viertel des normalen Ausgangswertes. Bei 0° C blieb die SDH-Aktivität noch länger erhalten, sie erreichte einen etwa gleich großen Abfall erst 25 bis 30 Tage nach dem Tode.

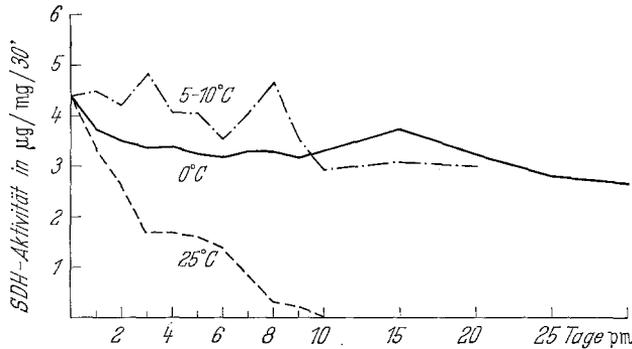


Abb. 5. Postmortales Verhalten der SDH-Aktivität (quantitativ bestimmt) im Herzmuskel von 62 Mäusen bei verschiedenen Temperaturen

Besprechung

Die Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen an Ratten, Kaninchen und menschlicher Skelettmuskulatur zeigen, daß die SDH-Aktivität in den verschiedenen Organen nach dem Tode in ungleichmäßiger Weise abnimmt. Dieser diskontinuierliche Aktivitätsabfall kommt besonders darin zum Ausdruck, daß in den ersten 24–48 Std post mortem keine nennenswerte Minderung der Reaktion zu erkennen ist und daß bei Mensch und Tier zwischen dem 3. und 7. Tag ein verhältnismäßig rascher Abfall bis zum völligen Verschwinden jeglichen SDH-Nachweises erfolgt. Es ist also nicht so, daß schon mit dem Tode oder kurz danach die SDH-Aktivität zum Erliegen kommt. Das Ferment muß demnach relativ widerstandsfähig sein. Erst im Zuge der allgemeinen Autolyse, in der auch die größeren Gewebsstrukturen verändert werden, kommt es zu einem merklichen Nachlassen der Fermentaktivität. Nach diesen Feststellungen ist also in den ersten 24–48 Std nach dem Tode, zumindest histochemisch, noch mit verwertbaren Resultaten hinsichtlich Menge und Lokalisation der SDH zu rechnen. Im Hinblick auf die Beziehungen zur postmortalen Zeit sind Fermentuntersuchungen histochemischer Art jedoch mit Zurückhaltung zu bewerten, da sie durch verschiedene Umstände beeinflußt werden.

Die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Nachlassens der SDH-Aktivität ist vornehmlich von zwei Faktoren abhängig. Einmal von

dem normalen SDH-Gehalt des Gewebes; so zeigt z. B. der Herzmuskel als sehr fermentreiches Organ noch 7 Tage nach dem Tode eine deutliche SDH-Reaktion, wogegen Leber und Niere bereits negativ sind. Demnach hat die Quantität des zu Lebzeiten vorhandenen Fermentes einen maßgeblichen Einfluß auf seine postmortale Nachweisbarkeit. — Zum anderen wird die Geschwindigkeit des SDH-Abfalls durch die Temperatur, bei der die getöteten Tiere oder entnommenen Organe gelagert wurden, beeinflusst. Es gilt auch hier wie bei jeglicher Autolyse die bekannte Regel, daß die fermentativen Abbauvorgänge nach dem Tode bei höherer Temperatur schneller ablaufen als in der Kälte. — Allerdings ist die Fermentaktivität auch bei Unterkühlung des Gewebes nicht unbegrenzt zu erhalten, wie es z. B. unsere Untersuchungen am Kaninchenherz erkennen lassen; trotz Lagerung des Gewebes bei 0° C kam es hier, wenn auch nicht so ausgeprägt, so aber doch deutlich erkennbar zwischen dem 10. und 14. Tag post mortem zu einem Abfall der SDH-Aktivität.

Für die Praxis ergibt sich daraus zur Frage der histochemischen Todeszeitbestimmung, daß bei nicht zu niedriger Außentemperatur in unseren Breiten im Sommerhalbjahr und bei Zimmertemperatur mit etwa 20° C in einer Zeit von 24—48 Std nach dem Tode ein Beginn des Fermentabfalls in Form umschriebener, feinfleckiger, rötlicher Aufhellungen zu erwarten ist. Besonders geeignet sind für diese Untersuchungen die fermentreichen Organe wie Herzmuskel und Nieren, die zu Lebzeiten ein dichtes, nahezu homogenes SDH-Muster aufweisen.

Ein ähnliches Verhalten wie in den Geweben zeigte die SDH-Aktivität in den *Leukocyten*. Bei einer Lagerung von 20° C blieb auch hier die Fermentaktivität bis zum 2. Tage praktisch unverändert. Der Fermentnachweis wurde erst dann rasch schwächer und zwischen dem 7. und 10. Tag negativ. Eine Lagerung des Blutes bei 0° C führte dazu, daß erst mit dem 20. Tag post mortem die SDH nicht mehr nachzuweisen war. — Das Blut als gut zugängiges und leicht zu bearbeitendes Untersuchungsmaterial bringt praktisch die gleichen Ergebnisse im Hinblick auf das postmortale Verhalten der SDH-Aktivität wie die kompliziertere Auswertung der Gewebe. Als sichere und relativ einfache Methode zur Darstellung der SDH empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen die Methode von MORRISON und KROHNLEIN.

Die histochemischen Nachweise haben den Nachteil, daß sie keine genauen Aussagen über das wirkliche Ausmaß an vorhandenen spezifischen Dehydrogenasen erlauben. Es wurde deshalb eine von NANKAWA und TAWA für diese Belange abgewandelte Methode zur chemisch-quantitativen Bestimmung der SDH-Aktivität verwendet. Eine Serienuntersuchung an insgesamt 72 Mäuseherzen ergab besonders in der

ersten Zeit nach dem Tode feinere Abstufungen der Fermentaktivität. Bei einer Lagerung des Gewebes unter einer Temperatur von 25° C ließ sich schon einen Tag nach der Tötung ein deutlicher Abfall der SDH feststellen. — Im Vergleich zum histochemischen Verfahren ermöglicht die chemische Methode bereits in den ersten 24 Std post mortem die Erkennung eines quantitativen Abweichens vom Lebendstatus. Allerdings sind zahlenmäßig kleine Unterschiede mit Veränderung der ersten Dezimale nicht zu verwerten; sie liegen im Bereich der individuellen Streubreite. Nach unseren Erfahrungen berechtigt erst eine Abweichung von etwa 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}/30'$ zu verbindlichen Rückschlüssen.

Wenn die vorliegenden Untersuchungsergebnisse scheinbar nur von theoretischem Interesse sind, so haben sie für die Grundlagenforschung doch eine gewisse Bedeutung. Mit histochemischen Methoden allein wird es wohl kaum möglich sein, in dem gerade für die Gerichtsmedizin so wichtigen frühpostmortalen Intervall (vgl. SCHLEYER) zur Todeszeitbestimmung verbindliche Aussagen zu machen; solche sind erst in einem Zeitraum von 24—48 Std möglich. Das chemisch-quantitative Verfahren von NANIKAWA und TAWA dagegen bietet nach unseren Erfahrungen am Tiermaterial mehr Aussicht auf verwertbare Rückschlüsse.

Zusammenfassung

Zum histochemischen Nachweis der postmortalen SDH-Aktivität wurden nach der Methode von WACHSTEIN und MEISEL Herzmuskel, Niere, Leber und Skelettmuskel von 14 Ratten und 3 Kaninchen sowie mehrere Muskelgruppen von vier Menschen in verschiedenen Zeitabständen nach dem Tode unter Beachtung verschiedener Temperatureinflüsse untersucht. Nach 24—48 Std kam es bei einer Lagerung unter 20° C zu ersten erkennbaren Abfällen der SDH-Aktivität im Schnittpräparat in Form umschriebener Aufhellungen; bei 0° erst nach 7 Tagen. Am längsten blieb die Aktivität in den fermentreichen Organen wie Herzmuskel und Nieren erhalten. Gleichartig verhielt sich die SDH-Aktivität in Leukocyten von Menschen und Kaninchen, die an Blutausstrichen nach der Methode von MORRISON und KROHNHEIM untersucht wurden. — Da histochemische Reaktionen keine genauen Aussagen über die Menge der vorhandenen SDH erlauben, wurden nach einem neuen, von NANIKAWA und TAWA entwickelten Verfahren quantitative Untersuchungen an 72 Mäuseherzen, die unter verschiedenen Temperaturen gelagert wurden, durchgeführt. Bei 25° C fand sich schon nach einem Tag ein deutlicher Abfall der SDH-Aktivität bis zu 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}/30'$; bei niedrigeren Temperaturen von 0 und 5—10° C fiel dagegen die Fermentaktivität nur geringfügig ab und blieb im wesentlichen bis zum 30. Tag p. m. erhalten. — Sollten weitere Untersuchungen

die vorliegenden Befunde bestätigen, dann ergäbe sich eine Möglichkeit für die postmortale Zeitbestimmung.

Summary

Post-mortem SDH activity was investigated histochemically (WACHSTEIN and MEISEL), in cardiac muscle, kidney, liver, and skeletal muscle. Fourteen rats, three rabbits, as well as several human muscle groups were examined at different time intervals after death and under various conditions of temperature. After storage for 24—48 hours below 20° C, cut sections showed the first SDH activity as areas of clarification. At 0° C, this clarification is first noted after 7 days. The activity in the ferment-rich organs (e.g. cardiac muscle, kidney) remained unchanged for the longest period. The same was noted in human and rabbit leucocytes which were examined in blood smears (MERRISON and KRONHEIM). Since an exact quantitative determination of SDH activity cannot be made from this histochemical reaction, we employed the method of NANIKAWA and TAWA. The hearts of 72 mice were investigated, according to this method, at different degrees of temperature. After 24 hours at 25° C, a falling off of SDH activity up to 1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}/30$ min was noted; whereas, at 0 and 5—10° C, the ferment activity changed only very slightly and remained substantial up to 30 days post mortem. Should further investigation confirm these results, post mortem time determinations could be made.

Literatur

- BENEKE, G., u. H. SIMON: Über das Auftreten von Halb- und Monoreduktionsstufen bei Verwendung von Ditetrazoliumsalzen für den histotopochemischen Dehydrogenase-Nachweis. *Naturwissenschaften* **48**, 74 (1961).
- MORRISON, J. H., and S. KRONHEIM: The cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in mouse leucocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 402 (1962).
- NANIKAWA, R., and N. TAWA: A colorimetric method of determination of succinic dehydrogenase activity in animal tissues by neotetrazolium. *Nagoya med. J.* **6**, 13 (1960). Ref. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **52**, 302 (1961/62).
- H. HAMAOKA, and Y. AWATA: Studies on the succinic dehydrogenase of cardiac muscle. Chemical and histochemical findings in carbon monoxide poisoning, death from cold and hypoxigen respiration. *Nagoya med. J.* **6**, 27 (1960).
- NEUMANN, K., u. G. KOCH: Übersicht über die feinere Verteilung der Succinodehydrogenase in Organen und Geweben verschiedener Säugetiere, besonders des Hundes. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **295**, 35 (1953).
- PADYKULA, H. A.: The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. *Amer. J. Anat.* **91**, 107 (1954).
- PEARSE, A. G. E.: Intracellular localization of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 515 (1957).
- *Histochemistry, theoretical and applied.* London: J. and A. Churchill Ltd. 1960.

- RUTENBURG, A. M., M. WOLMAN, and A. M. SELIGMAN: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technic. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 66 (1953).
- SCHLEYER, F.: Postmortale klinisch-chemische Diagnostik und Todeszeitbestimmung mit chemischen und physikalischen Methoden. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Succinic dehydrogenase activity in myocardial infarction and in induced myocardial necrosis. *Amer. J. Path.* **31**, 353 (1955).
- WOHLRAB, F.: Der histochemische Nachweis der Succinodehydrogenase mit Stilbentetrazoliumchlorid. *Acta histochem. (Jena)* **12**, 310 (1961).

Prof. Dr. med. R. NANIKAWA

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Tottori, Yonago, Japan

Priv.-Doz. Dr. med. W. JANSSEN

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg, Voßstr. 2