

- LEVONEN, E., J. RAEKALLIO, and J. SAIKKONEN: Post-mortem determination of blood creatinine and urea. *J. forens. Med.* **10**, 22 (1963).
- LUND, A.: Adrenaline and noradrenaline in blood from cases of sudden, natural and violent death. Proc. 3rd Int. Meet. Forens. Immunol. etc., London 1963 (Excerpta Med., Congr. Series No 80), p. 88 und pers. Mitt.
- MALLACH, H., u. G. LAUDAHN: Vergleichende Untersuchungen mit enzymatischen Methoden an Vital- und Leichenblut usw. *Klin. Wschr.* **42**, 693 (1964).
- OKUBO, T.: On the spectro-extinction and the colour tint of aqueous humor. *Nagasaki Igakkai Zassi* **34**, 1536 (1959).
- PAPENBERG, K., H. BOCK u. H. NIETH: Phosphathaltige Metabolite im Blut unter Berücksichtigung urämischer Zustände. *Klin. Wschr.* **40**, 936 (1962).
- SCHLEYER, F.: Postmortale klinisch-chemische Diagnostik usw. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- Versuche zur Todeszeitbestimmung aus dem Phosphatgehalt des Kammerwassers. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **52**, 231 (1962).
- Determination of the time of death in the early post-mortem interval. In: *Methods of Forensic Science*, vol. II. London: John Wiley & Sons 1963.
- , u. U. JANITZKI: Untersuchungen über den postmortalen Phosphatgehalt von Liquor und Serum. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 229 (1959).
- , u. W. PIOCH: Untersuchungen über den postmortalen Liquor-pH usw. *Zacchia* **33**, 279 (1958).
- STURNER, W.: The vitreous humor etc. Proceed. 3rd Int. Meet. Forens. Immunol. etc., London 1963. (Excerpta Med. Congr. Ser. No 80), p. 181.
- WAGNER, H.: Die Bedeutung der Antibiotica und Sulfonamide für Todes- und Tatzeitbestimmungen usw. *Habil.-Schr. Mainz* 1960.

Prof. Dr. F. SCHLEYER  
 Direktor des Instituts für gerichtliche Medizin  
 der Universität  
 355 Marburg, Mannkopffstraße 2

**W. LAVES (München): Der blutchemische Nachweis der vitalen Reaktion.** Siehe diese *Z.* **57**, 424 (1966).

**W. LAVES und H. CORREL (München): Vitale und postmortale Blutungen (Dünnschichtchromatographie).**

**J. RAEKALLIO (Turku): Über die fermenthistochemischen vitalen Reaktionen von Hautwunden<sup>1</sup>.**

*Einleitung und Methodik*

Es gibt bekanntlich kaum einen Begutachtungsfall in der forensischen Pathologie, in dem uns nicht die Frage der vitalen Reaktion in irgend-

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden finanziell durch die Sigrid-Jusélius-Stiftung in dankenswerter Weise unterstützt.

einer Form beschäftigt. So ist und bleibt eine Hauptaufgabe des gerichtsmedizinisch tätigen Arztes die Klärung der Frage, ob der Tod als Folge einer Gewalteinwirkung eingetreten ist, und ob die Gewalteinwirkung vital oder postmortal erfolgte.

MUELLER faßte in seinem Lehrbuch (1953) die wenigen sicheren örtlichen Zeichen für die vitale Entstehung einer Verletzung kritisch zusammen: das Vorhandensein von Blutungen mit erheblicher Fibrinbildung, das Auftreten von cellulären Entzündungserscheinungen mit Phagocytose, Blutresorption in benachbarten Lymphknoten und thrombotische Veränderungen an verletzten Gefäßen. Wenn man jetzt mit MUELLER (1964) feststellen muß, daß das Auftreten von Blutungen und der Nachweis von Fibrin in ihnen nicht mehr als vitale Reaktion gilt, und daß man auch die Blutresorption mit Vorsicht beurteilen soll, bleiben nur die Thrombose und die Entzündungsreaktionen übrig. Die thrombotischen Veränderungen an benachbarten Gefäßen sind bekanntlich nicht immer nachweisbar. So steht die *Entzündung* im Mittelpunkt der örtlichen vitalen Reaktion.

Als in den dreißiger Jahren (WALCHER, 1936) vitale und postmortale Verletzungen mikroskopisch untersucht wurden, konnte man nachweisen, daß das früheste *histologische* Zeichen der Entzündung Leukocytenreaktion war: Leukocytose des örtlichen Gefäßblutes, Randstellung, Auswanderung und extravasculäre Ansammlung der Leukocyten. Die Randstellung kann nach PROKOP (1960) schon nach 30 min beginnen, ist aber sehr schwer zu beurteilen, da es sich um Zufälle handeln kann. Das gleiche gilt auch für das Auftreten von einzelnen Leukocyten, die ja ein regelmäßiger Bestandteil des Bindegewebes sind. Anders liegt die Sache, wenn man in der Umgebung von Wunden *herdförmige Leukocytenansammlungen* erkennt. Angaben über das Vorkommen einer deutlichen cellulären Reaktion variieren sehr stark (etwa von 4 Std, WALCHER, 1936, bis sogar 24 Std nach dem Trauma, ALLGÖWER, 1956), und lassen nicht immer erkennen, welchem Ausmaß der entzündlichen Leukocytenansammlung die Zeitangaben zugeordnet werden sollen. Nach eigener Erfahrung (RAEKALLIO, 1961, 1964a, 1965a, b) zeigten sich 4 Std nach der Verletzung einige polymorphkernige Leukocyten außerhalb der Gefäße. Nach 8 Std war eine deutliche leukocytäre Infiltration in der peripheren Wundzone zu ersehen. Auch BOLTZ (1951) und LINDNER (1962) beschreiben den Leukocytosebeginn in 4—8 Std alten Verletzungen.

Die histologische Methode hat eine wesentliche Lücke in der Diagnostik vitaler Veränderungen an Verletzungen geschlossen. Noch gab es aber eine Latenzperiode von mindestens 4—8 Std. Differenzierung dieser sog. „latenten“ Phase lag außerhalb der morphologisch-histologischen diagnostischen Möglichkeiten.

Heute ist bekannt, daß den morphologisch faßbaren Veränderungen der Zellen und Gewebe funktionelle Vorgänge vorausgehen, und daß diese ihrerseits auf die Tätigkeit der Fermente zurückzuführen sind. Es ist also zu erwarten, daß der Nachweis von Fermenten, die wichtige Vorgänge *verursachen*, früher Reaktionen anzeigen könnte als der Nachweis der resultierenden, morphologisch erfaßbaren Veränderungen an Wunden. Daß dies wirklich der Fall ist, ist an histochemischen Gewebsschnitten gezeigt worden (RAEKALLIO, 1960, 1961).

Beim histochemischen Fermentnachweis richtet sich die Aufmerksamkeit auf das Reaktionsprodukt der enzymatischen Aktivität. Das spezifische Inkubationsgemisch, wo die Gewebsschnitte bebrütet werden, wird so gewählt, daß an der Stelle der Fermentaktivität direkt oder indirekt ein farbiges und unlösliches Reaktionsprodukt erscheint. Von der Lage und Menge des farbigen Niederschlages wird auf Lage und Aktivität des betreffenden Ferments geschlossen. Für Einzelheiten der fermenthistochemischen Methoden und ihrer Anwendung in der gerichtlichen Medizin wird auf eine Neuerscheinung verwiesen (RAEKALLIO, 1965a). Hier sei nur betont, daß es sowohl fixierte als auch unfixierte Gewebsstücke zum Nachweis der Fermentaktivität verwendet werden können, weil einige Enzyme Fixation im kalten, neutralen Formalin vertragen, andere aber dafür zu empfindlich sind. Sowohl aus fixiertem als auch aus frischem Gewebe kann man Gefrierschnitte z. B. in einem sog. Kryostat herstellen. Der Kryostat ist eigentlich nichts anderes als ein Kühlapparat mit eingebautem, gewöhnlich von außen her bedienbarem Mikrotom.

Zur Darstellung der Aktivität der brauchbarsten Fermente wurden die folgenden Methoden bevorzugt: alkalische Phosphatase nach GROGG und PEARSE (1952a), Adenosin-Triphosphatase nach PADYKULA und HERMAN (1955), saure Phosphatase nach GROGG und PEARSE (1952b), Aminopeptidase nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (1957) und Esterasen nach PEARSE (1953).

#### *Material*

Das experimentelle Material bestand aus 210 Meerschweinchen und aus 195 weiße Ratten. Rundliche Excisionswunden, mit einem Durchmesser von 5 mm und Stichwunden, mit einem Durchmesser von 1 mm, wurden an rasierten Rückenhaut erzeugt. Auch wurde mit der durch stumpfe Gewalt entstandenen Wunden experimentiert, obgleich der größte Teil des gesamten Materials aus Tieren mit Schnitt- und Stichwunden bestand. Die Tiere wurden getötet: 1, 5, 15, 30 min, oder 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72, 96 und 120 Std nach der vitalen Verletzung. Die Hautstücke mit je einer Wunde wurden unmittelbar histochemisch und histologisch untersucht. Nach dem Tode wurde die andere Hälfte derselben Tiere gleichartig in entsprechenden Zeitabständen, d. h. bis zum 5. Tage post mortem, verwundet. Die postmortale Nachweisbarkeit der vital erzeugten Veränderungen wurde nach 1, 2, 3, 4 oder 5 Tagen geprüft.

Die Verletzungen am gerichtsmedizinischen Leichenmaterial (67 Leichen) bestanden gleichweise aus Schnitt- und Stichwunden oder waren durch stumpfe Gewalt verursacht worden. Die Überlebenszeit schwankte in weiten Grenzen: von einigen Minuten bis zu mehreren Tagen. Auch die Autolyseperiode nach dem Tode variierte: meistens betrug sie 1—2 Tage, einige Leichen konnten aber erst 3—4 Tage nach dem Tode untersucht werden.

### *Ergebnisse und Diskussion*

Mittels fermenthistochemischen Methoden kann man zwei Zonen in der Umgebung vitaler Wunden unterscheiden (Abb. 1). In der 200—500  $\mu$  tiefen *inneren Zone* erkennt man eine abnehmende Enzymaktivität. Da

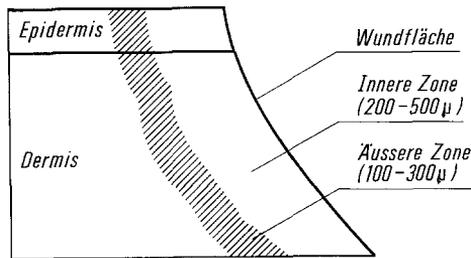


Abb. 1. Die Zonen in der Umgebung von vitalen Hautwunden (schematisch)

keine entsprechenden Veränderungen in den postmortal erzeugten Wunden vorkommen, kann man die Verminderung der Fermentaktivität der inneren Zone *negative vitale Reaktion* nennen. Sie ist ein Ausdruck der Nekrobiose des wundnahen, irreversibel zerstörten Gewebes.

Ganz anders sieht die 100—300  $\mu$  tiefe, die innere Zone umgebende *äußere Zone* aus, wo man eine zunehmende Fermentaktivität erkennt. Da keine aktivierte Zone in der Umgebung von postmortalen Wunden erkennbar ist, kann die Zunahme der Fermentaktivität in der äußeren Zone *positive vitale Reaktion* genannt werden. Die allererste Zunahme der Fermentaktivität in der äußeren, nur Reversibel geschädigten (d. h. gereizten!) Zone ist als Aktivierung ortsständiger Bindegewebszellen aufzufassen. Dieser Vorgang ist als Anpassungsphänomen der Zellen anzusehen (RAEKALLIO, 1961, 1965 a, b).

Als Beispiele mögen die Abb. 2, 3, 4 und 5 die fermenthistochemischen vitalen Reaktionen veranschaulichen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die fermenthistochemischen Methoden sehr frühzeitig vitale Reaktionen entschleiern (Abb. 6). So erkennt man bei Darstellung der Esterase und Adenosin-Triphosphatase vitale Reaktionen schon nach einstündiger Überlebenszeit, bei Amino-peptidase nach 2 Std, bei saurer Phosphatase nach 4 Std, und bei alkalischer Phosphatase nach 8 Std. Auch bei der histologischen Untersuchung, die immer als Vervollständigung der Histochemie durchgeführt

werden soll, kann man nach 8 Std einen Zellwall von eingewanderten polymorphkernigen Leukocyten in der äußeren Zone nachweisen (RAEKALLIO, 1961). Diese Zellen werden nach 16stündiger Überlebenszeit von mononucleären Phagocyten verdrängt.

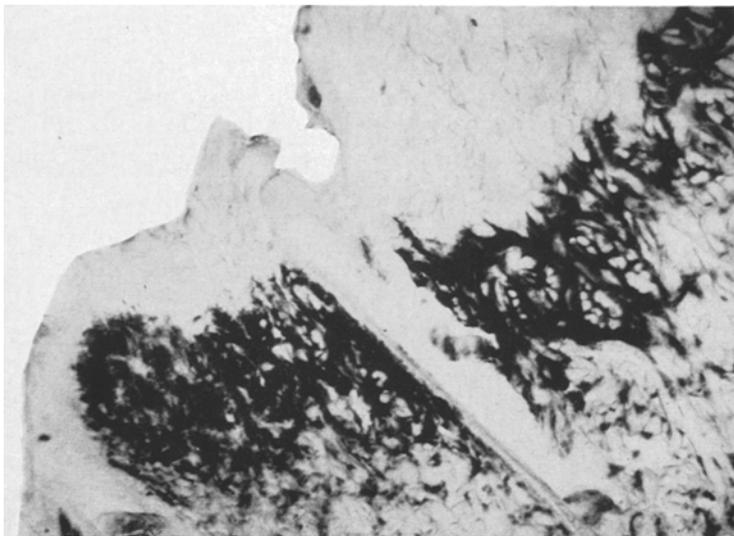


Abb. 2. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in einer vitalen Wunde von Meerschweinchen. Überlebenszeit 8 Std. In der äußeren Zone sieht man eine positive vitale Reaktion, d. h. eine vermehrte Fermentaktivität. In der inneren Zone erkennt man eine negative vitale Reaktion, d. h. die Fermentaktivität der inneren Zone ist geringer als in der unverletzten Haut. 100 ×

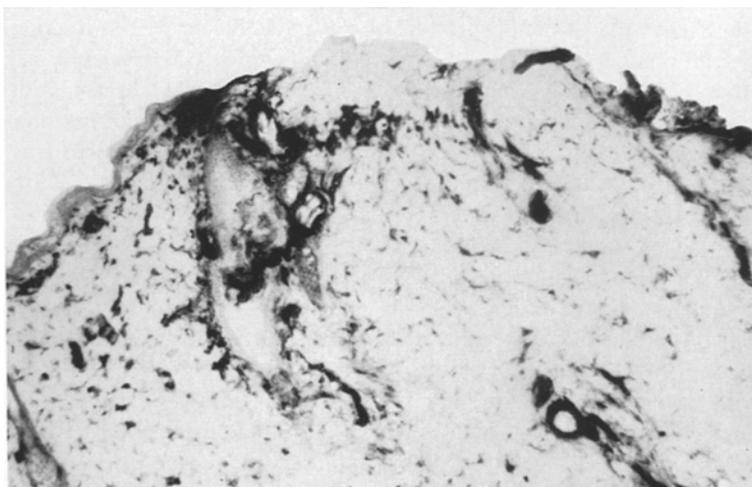


Abb. 3. Die Aktivität der Adenosin-Triphosphatase in einer vitalen menschlichen Schnittwunde. Überlebenszeit 1½ Std. Autolysezeit 18 Std. 100 ×

Mit zunehmender Überlebenszeit werden die vitalen Reaktionen gewöhnlich noch auffälliger. Es ist von großer praktischer Bedeutung, daß

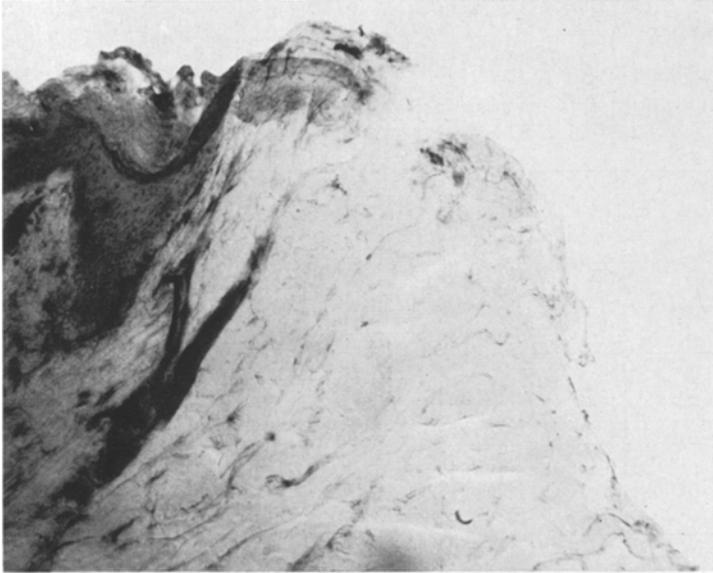


Abb. 4. Die Aktivität der Adenosin-Triphosphatase in einer postmortalen menschlichen Schnittwunde, die 1 Std nach dem Tode verursacht wurde. Autolysezeit 18 Std (bei + 4°C). Man sieht keine positiven oder negativen vitalen Reaktionen. 150 ×

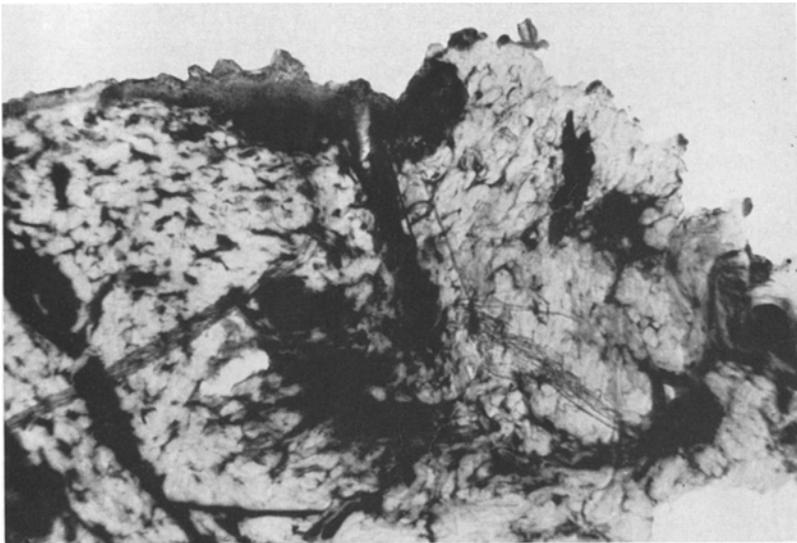


Abb. 5. Die Aktivität der Adenosin-Triphosphatase in einer vitalen menschlichen Schnittwunde. Überlebenszeit etwa 2 Std. Autolysezeit 18 Std. 150 ×

die fermenthistochemischen vitalen Reaktionen mindestens noch 5 Tage nach dem Tode nachweisbar sind. Vergleichbare Befunde an Brandwunden sind neuerdings von PROCH berichtet worden.

Bisherige Beobachtungen an Sektionsmaterial stehen im großen und ganzen im Einklang mit den experimentellen Befunden. Bei Sektionsbefunden sind freilich gewisse zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. Nach der bisherigen Erfahrung spielt das Alter des Verwundeten keine

Alter der vitalen Wunden	ATP-ase	Esterase	Amino-peptidase	Saure Phosphatase	Alkal. Phosphatase	Poly-morphkern. Zellans.	Mono-nucl. Zellans.
≙ 16 Stunden	■	■	■	■	■	■	■
≙ 8 Stunden	■	■	■	■	■	■	■
≙ 4 Stunden	■	■	■	■	■	■	■
≙ 2 Stunden	■	■	■	■	■	■	■
≙ 1 Stunde	■	■	■	■	■	■	■

Abb. 6. Enzymhistochemische Altersbestimmung vitaler Wunden (schematisch)

maßgebende Rolle beim Nachweis der fermenthistochemischen vitalen Reaktionen, wenn es sich nicht um allzu extreme Fälle handelt. Dagegen Zustände wie fortgeschrittene Senilität, sehr schwere Verletzungen mit schwerster Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes, weiter Gehirnverletzungen, können natürlich auch das örtliche Reaktionsvermögen der Haut beeinträchtigen und dadurch die Altersbestimmung der Wunden komplizieren. Es ist so ohne weiteres ersichtlich, daß man niemals auf Grund *eines* histochemischen oder histologischen Befundes an irgendeiner Verletzung eine Altersbestimmung wagen kann. Es gehören — heute wie früher — stets der ganze makroskopische Befund, Tatortsbesichtigung, und — soweit vorhanden — auch die Anamnese dazu.

Was Neues haben also diese fermenthistochemischen Methoden mitgebracht?

1. Eine *genauere Altersbestimmung* der Wunden, insbesondere derjenigen, die während 1—16 Std vor dem Tode entstanden sind.

2. Mit fermenthistochemischen Methoden wird die *Unterscheidung zwischen vitalen und postmortalen Wunden möglich etwa 4—8mal früher als mit den konventionellen histologischen Methoden*, d. h. nach einer Überlebenszeit von 1 Std.

#### *Zusammenfassung*

Durch scharfe und stumpfe Gewalt entstandene Wunden an etwa 400 Tieren und an 67 menschlichen Leichen wurden histochemisch und histologisch untersucht.

Mit fermenthistochemischen Methoden kann man zwei Zonen in der Umgebung vitaler Wunden unterscheiden. In der 200—500  $\mu$  tiefen inneren Zone erkennt man eine abnehmende Enzymaktivität. Da keine entsprechende Veränderungen in den postmortal gesetzten Wunden vorkommen, kann man die Verminderung der Fermentaktivität der inneren Zone negative vitale Reaktion nennen.

In der 100—300  $\mu$  tiefen äußeren Zone erkennt man eine zunehmende Fermentaktivität. Diese kann positive vitale Reaktion genannt werden, da keine aktive Zone in der Umgebung von postmortalen Wunden erkennbar ist.

Weil die fermenthistochemischen vitalen Reaktionen in einer bestimmten Reihenfolge erscheinen (Adenosin-Triphosphatase und Esterasen ab 1 Std, Aminopeptidase ab 2 Std, saure Phosphatase ab 4 Std und alkalische Phosphatase ab 8 Std nach der Wundsetzung), kann man auch das Alter der Wunde schätzen. Mit fermenthistochemischen Methoden wird die Unterscheidung zwischen vitalen und postmortalen schon nach einer Überlebenszeit von 1 Std möglich, also etwa 4—8mal früher als mit den konventionellen histologischen Methoden.

Die bisherigen Erfahrungen an Leichenmaterial stimmen größtenteils mit den experimentellen Befunden überein.

#### *Summary*

An experimental study was made on about 400 guinea-pigs and rats, by wounding the dorsal skin. The animals were killed 1, 5, 15, and 30 minutes, or 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 72, 96 and 120 hours after wounding. To every wound several methods of enzyme histochemistry were applied. The postmortem demonstrability of the vital changes and the exclusion of possible postmortem phenomena, simulating vital reactions, were investigated analogously, by using each animal as its own control.

An additional investigation was made on a medicolegal autopsy material, consisting of 67 bodies. Some of the injuries were caused by blunt force but most of them were stab or cutting wounds. The wounded had died after a posttraumatic period of some minutes to several days. The bodies could be autopsied usually 1—2 days after death.

Two zones could be noticed around the vital wounds. In the central wound zone, 200 to 500  $\mu$  in depth, there was a gradual loss of enzyme activity. This was demonstrable from one to 16 hours after the vital injury, depending on the enzyme studied. Since no such decrease was observed in the wounds made after death, the regressive phenomena in the central zone were called negative vital reactions.

Surrounding the central area of the vital wounds, a 100 to 300  $\mu$  deep peripheral zone exhibited an increase in enzyme activity. The activity of esterases, adenosine triphosphatase, and  $\beta$ -glucuronidase increased as early as one hour, the activity of aminopeptidase 2 hours, that of acid phosphatase 4 hours, and the activity of alkaline phosphatase 8 hours after vital wounding. These increases in enzyme activity in the peripheral zone were called positive vital reactions, since there were no such changes in post-mortem wounds.

Both types of vital reactions were recognizable for five days after death.

The consecutive appearance of the positive vital reactions, demonstrable by the methods of enzyme histochemistry, allow the construction of a biological time-table which is useful in the estimation of the age of wounds. The distinction between vital and post-mortem wounds is histochemically possible after a posttraumatic period of one hour only, i.e. about 4 to 8 times earlier than by using the conventional histologic techniques.

The data obtained from the autopsy material are chiefly compatible with the experimental results.

### Literatur

- ALLGÖWER, M.: The cellular basis of wound repair. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1956.
- BOLTZ, W.: Histologische Untersuchungen an Injektionsstichspuren. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **40**, 181 (1951).
- GROGG, B. S., and A. G. E. PEARSE: Coupling azo-dye methods for histochemical demonstration of alkaline phosphatase. Nature (Lond.) **170**, 578 (1952a).
- — A critical study of the histochemical techniques for acid phosphatase, with a description of an azo-dye method. J. Path. Bact. **64**, 637 (1952b).
- LINDNER, J.: Die Morphologie der Wundheilung. Langenbecks Arch. klin. Chir. **301**, 39 (1962).
- MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.
- Zur Frage der Unterscheidung von vitalen bzw. agonalen und postmortalen Blutungen. Acta Med. leg. soc. (Liège) **17**, 43 (1964).
- NACHLAS, M. M., D. T. CRAWFORD, and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. **5**, 264 (1957).
- PADYKULA, H., and E. HERMAN: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. J. Histochem. Cytochem. **3**, 161 (1955).

- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied, 1st ed., London: J. & A. Churchill 1953.
- PIOCH, W.: Histochemische Untersuchungen über die Darstellbarkeit früher Zell- und Gewebsalterationen nach lokaler Hitzeinwirkung auf die Haut von Mäusen und Meerschweinchen. Habil.-Schr. Bonn 1963.
- PROKOP, O.: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1960.
- RAEKALLIO, J.: Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing. *Nature (Lond.)* **188**, 234 (1960).
- Histochemical studies on vital and post-mortem skin wounds. Experimental investigation on medicolegally significant vital reactions in an early phase of wound healing. *Ann. Med. exp. Fenn.* **39**, Suppl. 6 (1961).
- Histochemical distinction between antemortem and postmortem skin wounds. *J. forens. Sci.* **9**, 107 (1964a).
- Histochemie des heilenden Bindegewebes. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **4**, 106 (1964b).
- Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Lübeck: Max Schmidt-Römhild 1965a.
- Histochemical demonstration of enzymatic response to injury in experimental skin wounds. *Exp. molec. Path.* **4**, 303 (1965b). (Weitere Literaturhinweise.)
- WALCHER, K.: Die vitale Reaktion bei der Beurteilung des gewaltsamen Todes *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **26**, 193 (1936).

Professor Dr. J. RAEKALLIO  
 Direktor des Instituts für gerichtliche Medizin  
 der Universität Turku  
 Turku 3/Finland

**R. LINDFORS (Helsinki): Histochemische Untersuchungen über die frühe Vitalreaktion im Zentralnervensystem.**

**G. APEL und W. WILKES (Berlin): Pseudovitale Blutungen im Halsbereich nach Thoraxkompression.**

Wasserleichen in schiffbaren Gewässern sind durch den Schiffsverkehr verschiedenen Gewalteinwirkungen ausgesetzt. Nicht nur die rotierenden Schrauben erzeugen Verletzungen, auch der Rumpf des fahrenden Schiffes wirkt auf die im Wasser treibende Leiche ein. Durch den Sog wird sie gegen den Schiffsboden gepreßt, in Richtung der Schrauben weiter befördert und im Schraubenkanal tordiert. Als Folge davon findet man außer den scharfen Schraubenverletzungen, Schädelzertrümmerungen und Rippenserienfrakturen sowie andere Knochenbrüche.

Bei derartig zugerichteten Leichen sahen wir gelegentlich ausgedehnte Blutungen in den Halsweichteilen, welche makroskopisch bei den schon faulen Leichen wie vital entstanden anmuten.