

Die spurenkundliche Bedeutung der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase

G. HEIDEL

Institut für Gerichtliche Medizin
der Medizinischen Akademie „C. G. CARUS“, Dresden
(Direktor: Prof. Dr. W. REIMANN)

Eingegangen am 1. Juli 1967

Die von HOPKINSON, SPENCER und HARRIS (1963) beschriebenen Typen der sauren Erythrocytenphosphatase werden schon seit einiger Zeit als neues Merkmal zum Blutgruppengutachten in Fällen strittiger Vaterschaft herangezogen. In Deutschland wurde ihre Bestimmung erstmals routinemäßig im Berliner Institut für Gerichtliche Medizin (PROKOP) nach einer von RADAM und STRAUCH (1966) beschriebenen Methodik eingeführt.

Wie REIMANN und HEIDEL (im Druck) an verschiedenen Tierbluten nachweisen konnten, zeigt die saure Erythrocytenphosphatase nicht nur Typenpolymorphismus beim Menschen, sondern auch Artspezifität. Den verschiedenen Tierarten entsprechen jeweils eigene, durch Zahl, Intensität und Anordnung der Aktivitätszonen von den menschlichen unterschiedene Typen.

HEIDEL und REIMANN (im Druck) untersuchten die Möglichkeit des Nachweises der Phosphatasetypen am Blut von Leichen verschiedener Liegedauer. Eine Typenzuordnung war in allen untersuchten Fällen möglich, wobei eine deutliche Diskrepanz zwischen relativ fortgeschrittenen Leichenveränderungen (Liegedauer bis zu 1 Monat) und noch zweifelsfrei bestimmbar Typ auffällig war. Er konnte auch dann noch bestimmt werden, wenn die klassische Blutgruppe nicht mehr sicher faßbar war.

Die vorliegende Arbeit soll in Fortsetzung der bisherigen Untersuchungen zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit die Bestimmung der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase bei Blutspurenuntersuchungen, insbesondere angetrockneten Blutflecken, eingesetzt werden kann.

Material und Methode

Untersuchungsgut. a) Blutspuren: Blute mit bekannten Typen der sauren Erythrocytenphosphatase (A, AB, B, AC, BC) wurden sofort nach der Entnahme aus der Armvene auf Spurenläger aus unterschiedlichen Materialien aufgebracht. Als Spurenläger dienten Holz, Glas, PVC, Kacheln, Pappe und Teppichgewebe. Die Spuren wurden im Labor unter Lichteinwirkung und bei Zimmertemperatur (etwa 18°C) gelagert. Im Abstand von je 5 Tagen wurden von jeder Spur 40—50 mg (Einwaage) entnommen und in einem kleinen Röhrchen mit 2—3 Tropfen Aqua dest. gelöst. Es wurde darauf geachtet, die gerade noch zur Lösung notwendige geringste Wassermenge zuzusetzen, um die Konzentration des Enzyms so hoch wie möglich zu halten.

b) Leichenblute. In Ergänzung früherer Untersuchungen von HEIDEL und REIMANN (im Druck) wurden Blute von zwei Leichen mit längerer Liegezeit und stark fortgeschrittenen Leichenveränderungen entnommen (Herzblut).

1. Sekt.-Nr. 169/67 — hochgradige Fäulnis und teilweise Mumifizierung nach einer Liegezeit von mindestens 4 Monaten im Freien.

2. Sekt.-Nr. 206/67 — hochgradig faule Wasserleiche mit einer Verweildauer im Wasser von mindestens 1 Monat.

In beiden Fällen war das Leichenblut sehr hämolytisch. Wie schon früher von uns beschrieben, wurde das Blut ohne weitere Aufarbeitung elektrophoretisch aufgetrennt.

Elektrophorese. Gearbeitet wurde mit der in einigen Details modifizierten Methode nach RADAM und STRAUCH (1966). Das Gel wurde mit einem 0,012 M Phosphatpuffer (pH 6,0) bei einer Stärkekonzentration von 8,5 % bereit. Unsere Elektrophoresewanne hat die Innenabmessungen 22×14 cm und wird 0,7 cm hoch (220 ml) mit dem Gel gefüllt. Die Elektrodenkammern enthalten Brückenlösungen ungleicher Konzentrationen, auf der Anodenseite 0,4 M und auf der Kathodenseite 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0). Der Kathodenpuffer zersetzt sich elektrolytisch und muß nach jeder Elektrophorese erneuert werden.

Gute Auftrennungsergebnisse werden bei einem Strom von 50 mA (Stromdichte $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ Gelquerschnitt) bei $+5^\circ\text{C}$ nach 14 Std Laufzeit erreicht. Der Flüssigkeitsverlust wird durch blasenfreies Abdecken des Gels mit einer Polyäthylenfolie gering gehalten.

Als Träger für das Untersuchungsgut verwenden wir Filterpapierplättchen (Whatman Nr. 17) mit den Abmessungen 5×7 mm. Auf der Kammerbreite von 14 cm können etwa 12 Proben gleichzeitig untersucht werden.

Enzymnachweis. Die Substratlösung zum Enzymnachweis wird durch Auflösen von 250 mg Phenolphthaleindiphosphat (Na-Salz) in 60 ml 8fach verdünntem Brückenpuffer hergestellt. Das horizontal aufgeschnittene Gel wird 3 Std mit der Substratlösung bei 37°C inkubiert. Nach Alkalisieren mit einigen Tropfen 25% iger Ammoniaklösung werden die leuchtendroten Fraktionen sichtbar.

Ergebnisse

Untersucht wurden auf unterschiedliche Spureträger aufgebrachte Blutproben mit bekannten Typen der sauren Erythrocytenphosphatase. Zur Untersuchung gelangten jeweils 5 Proben der Typen A, AB, B, AC und BC auf den verschiedenen vorn genannten Spureträgern. Die Phosphatasetypen waren in allen Fällen bis zu einem Spurealter von 30 Tagen einwandfrei zu identifizieren (Abb. 1 und 2). Jenseits dieser Grenze waren einzelne Typen, besonders in der Unterscheidung von AB und B nicht mehr sicher zuzuordnen. Die A-Fraktion eines AB-Typs kann ihre Aktivität völlig verloren haben, während noch eine Restaktivität im B-Bereich nachweisbar ist. Da die Aktivitätsminderung entsprechend der Ausgangsaktivität im Bereich aller Fraktionen während der Spurealterung etwa linear vor sich geht, bleiben die charakteristischen Typenbilder bis zum Verfall der schwächsten Aktivität (A-Fraktion beim AB-Typ) nach etwa 30 Tagen, erhalten. Der Verfall der schwachen C-Aktivität beim AB- und B-Typ vor der 30-Tage-Grenze

hat keinen Einfluß auf die Identifizierbarkeit des Typs, da die wesentlichen Aktivitäten (A und/oder B) noch erhalten sind. Bei der Zuordnung von A-, AC- und BC-Typen gab es auch bei geringfügiger Überschreitung der 30-Tage-Grenze keine Schwierigkeiten.

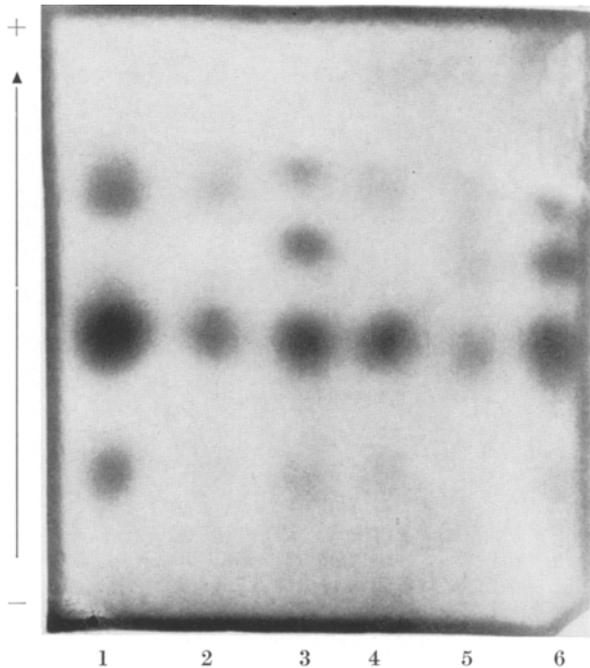


Abb. 1. Bestimmung des Phosphatasetyps an 25 Tage alten Blutflecken von unterschiedlichen Spurenlägern. 1. Typ B, Holz; 2. Typ B, Glas; 3. Typ AB, Holz; 4. Typ B, PVC; 5. Typ AB, Glas; 6. Typ AB, Teppich

Die von uns benutzten Spurenläger beeinflussen die Nachweisbarkeit der Typen in Abhängigkeit von ihrer Saugfähigkeit. Je leichter das Blutserum in den Spurenläger eindringt, um so besser gelingt der Nachweis der Phosphatasetypen auch nach längerer Zeit. Holz und saugfähige Pappe erwiesen sich dementsprechend als äußerst günstig, während z.B. die Spuren von Glas und PVC nur bei mindestens 50 mg Trockensubstanz nach 30 Tagen noch identifizierbare Ergebnisse lieferten.

In einem Gutachtenfall wurde versucht, den Phosphatasetyp einer auf Markisenstoff angetrockneten Blutspur zu bestimmen. Nach dem Ausfall der Uhlenhuthschen Reaktion handelte es sich nicht um menschliches Blut. Nach Angaben der Untersuchungsorgane sollte der Täter

möglicherweise einen Hund oder eine Katze erschossen haben, um die Funktionstüchtigkeit seiner Pistole zu prüfen. Der ermittelte Phosphatasetyp war deutlich von allen menschlichen Typen unterschieden. Er war charakterisiert durch eine ziemlich aktive Vorfraktion, eine stärkere

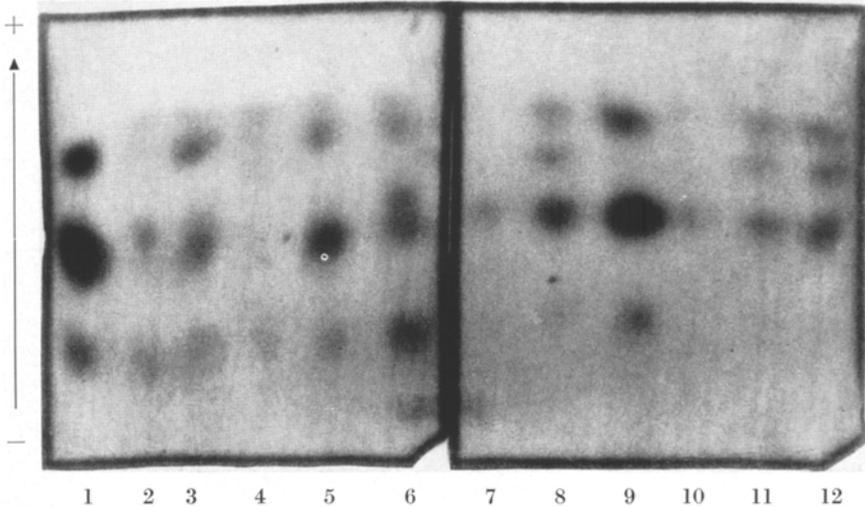


Abb. 2. Bestimmung des Phosphatasetyps an Spuren verschiedenen Alters, die von unterschiedlichen Spurenlägern isoliert wurden. 1. B, Holz, 5 Tage; 2. B, Holz, 35 Tage; 3. B, Glas, 30 Tage; 4. AB, Holz, 35 Tage; 5. B, Holz, 25 Tage; 6. BC, Holz, 30 Tage; 7. B, PVC, 30 Tage; 8. AB, Pappe, 30 Tage; 9. B, Holz, 15 Tage; 10. B, Pappe, 35 Tage; 11. AB, PVC, 30 Tage; 12. AB, Teppichgewebe, 30 Tage

A-Fraktion und eine schwache B-Fraktion, die um etwa eine Fraktionsbreite langsamer war als die entsprechende menschliche. Die von REIMANN und HEIDEL (im Druck) durchgeführten Tierblutuntersuchungen ließen Katzenblut ausschließen. Nach der Lage der Fraktionen kam möglicherweise ein noch nicht bekannter Hunde-A-Typ in Frage. Untersuchungen zahlreicher Blutproben verschiedenster Hunderassen ließen aber einen solchen nicht auffinden. Aus diesem Grunde wurden auf Holz angetrocknete Hundebblutspuren verschiedenen Alters untersucht. Bei 15 Tagen Spurenlage war ein Typenmuster zu beobachten, das mit dem der untersuchten Spur völlig identisch war (Abb. 3). Damit war nachgewiesen, daß es sich um Hundebblut handelte. Bei weiteren Tierblutuntersuchungen wird man einen Verfall der einzelnen Fraktionen unabhängig von der Ausgangsaktivität mit in Betracht ziehen müssen.

An beiden Leichenbluten ließ sich in Ergänzung früherer Untersuchungen der Phosphatasetyp einwandfrei bestimmen. Bei Sekt.-Nr. 169/67 wurde ein Typ B und bei Sekt.-Nr. 206/67 ein Typ AB gefunden.

Die einwandfreie Bestimmbarkeit des Phosphatasetyps steht hier, wie schon früher von uns festgestellt wurde, in deutlicher Diskrepanz zu den hochgradigen Leichenveränderungen und ist auch dann noch gewährleistet, wenn die klassische Blutgruppe nicht mehr zweifelsfrei faßbar ist.

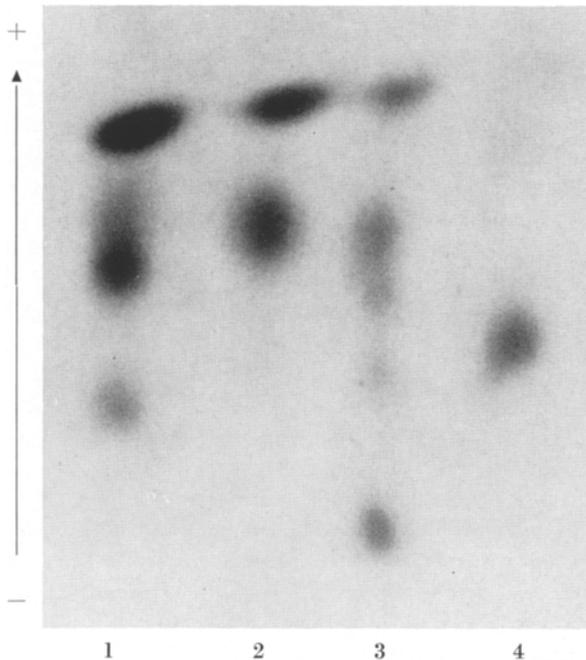


Abb. 3. Vergleich einer Hundeblutspur nach 15 Tagen mit aus menschlichen Blutspuren bestimmten Phosphatasetypen. 1. Hundeblut, Holz, 15 Tage — A- und B-Fraktion liegen hinter den entsprechenden menschlichen um etwa eine Fraktionsbreite zurück. 2. Typ A, 15 Tage, Holz; 3. Typ AC, 30 Tage, Holz; 4. Typ B, 30 Tage, Holz

Diskussion

Eine zweifelsfreie Bestimmung der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase aus angetrockneten Blutspuren ist bis zu einem Spurenalter von 30 Tagen in jedem Falle möglich. Wir würden es für zweckmäßig halten, den Phosphatasetyp bei ausreichendem Spurenmaterial als zusätzliches Merkmal zu bestimmen. In Fällen, bei denen die klassische Blutgruppe nicht mehr zweifelsfrei faßbar ist, dürfte die Bestimmung des Phosphatasetyps allein sicher aussichtsreich sein. Besonders dann, wenn eine Blutspur mit einem Leichenblut nach längerer Liegezeit verglichen werden muß, kann die Bestimmung des Phosphatasetyps

möglicherweise aussichtsreicher sein als die Bestimmung der am Leichenblut oft nicht mehr zweifelsfrei faßbaren klassischen Blutgruppe. Die von HEIDEL und REIMANN (im Druck) durchgeführten Bestimmungen des Phosphatasetyps an Leichenbluten und auch die beiden hier angeführten Fälle berechtigen zu dieser Annahme.

REIMANN und HEIDEL (im Druck) haben schon früher auf die mögliche spurenkundliche Bedeutung der artspezifischen Typen der sauren Erythrocytenphosphatase hingewiesen. Die Bestimmung des Phosphatasetyps liefert bei menschlichen Blutspuren das entsprechende Typenbild. Handelt es sich um ein Tierblut, so spricht das Typenbild einmal gegen die menschliche Herkunft und erlaubt andererseits den direkten Schluß auf eine bestimmte Tierspezies. Das Eiweißdifferenzierungsverfahren nach UHLENHUTH kann möglicherweise eingespart und durch die Bestimmung des Phosphatasetyps, die zudem noch frei ist von übergreifenden Verwandtschaftsreaktionen, ersetzt werden. In einem vorn angeführten Gutachtenfall erwies sich uns dieses Verfahren als günstig.

Eine gewisse Parallele dazu bildet die Unterscheidung von Tier- und Menschenblut durch die Darstellung des Serumesterase-Musters. LAWRENCE, MELNIK und WERNER (1960) beschrieben Speciesverschiedenheiten im molekularen Bau der Serumesterasen. SAMICO u. a. (1962) erbrachten durch Untersuchung von Blutarten als extrahierte Trokenspuren den Nachweis der Anwendbarkeit in der Spurenkunde. Durch elektrophoretische Auftrennung im Stärkegel erhält man für die jeweilige Tierart charakteristische und von dem menschlichen deutlich unterschiedene Muster der Serumesteraseaktivität.

Weitere Untersuchungen über die Gesetzmäßigkeit der Alterung verschiedener Tierblutspuren stehen noch aus. Möglicherweise zeigen noch weitere Tierarten bei der Spurenalterung eine ähnliche Diskontinuität in der Aktivitätsabnahme des Phosphatasetyps, wie sie beim Hundeblood beobachtet werden konnte.

Zusammenfassung

Es wird über die Möglichkeit des Nachweises der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase in Blutspuren bis zu einem Spurenalter von 30 Tagen berichtet. Anwendungsmöglichkeiten, auch hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen Tier- und Menschenblut, werden diskutiert.

Summary

Report on the possibility of acid phosphatase typing of red cells in dried blood stains to extremely 30 days storage. Use of this method including differentiation of animal and human blood is discussed.

Literatur

- HEIDEL, G., u. W. REIMANN: Bestimmung der sauren Phosphatase der Erythrozyten im Leichenblut. (im Druck).
- HOPKINSON, D. A., N. SPENCER, and H. HARRIS: Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. *Nature (Lond.)* **199**, 969 (1963).
- LAWRENCE, MELNIK, and WERNER: A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. *Proc. Soc. exp. Biol.* **105**, 572 (1960).
- RADAM, G., u. STRAUCH: Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966).
- REIMANN, W., u. G. HEIDEL: Artspezifische Typen der sauren Erythrozytenphosphatase. (im Druck).
- SAMICO, A., H. COUTINHO, J. ROCHA, and R. HUNTER: The zymogram method etc. *J. forens. Sci.* **7**, 480 (1962).

Dr. med. G. HEIDEL
Institut für Gerichtliche Medizin
der Medizinischen Akademie Dresden
X 8019 Dresden, Fetscherstraße 74