

## Möglichkeiten der biochemischen Wundaltersbestimmung\*

S. BERG, J. DITT, D. FRIEDRICH und W. BONTE

Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Göttingen  
(Direktor: Prof. Dr. S. BERG)

Eingegangen am 13. November 1967

Trotz des großen Fortschrittes der histochemischen Technik (RAEKALLIO, PROCH) sind die Möglichkeiten zur morphologischen Altersansprache von forensisch wichtigen Hautverletzungen innerhalb der ersten 12 Std noch sehr beschränkt. Nach den Ergebnissen der biochemischen Wundheilungsforschung (MENKIN, MEIER, KÜHNNAU, LINDNER u. a.) ist aber schon innerhalb der ersten Minuten nach der Verletzung mit chemischen Alterationen zu rechnen, welche die frühen funktionellen Lokalreaktionen — Vasodilatation und steigende Capillarpermeabilität — einleiten. Neben Bradykinin und Kallidin scheinen in dieser frühesten Phase insbesondere das Histamin und das Serotonin eine Rolle zu spielen.

Ob in der Haut auf äußere Reize hin Histamin freigesetzt wird, ist ja seit den grundlegenden Arbeiten von LEWIS von zahlreichen Untersuchern geprüft und diskutiert worden. Manche Widersprüche gehen auf unterschiedliche Entnahmezeiten, aber auch Bestimmungsmethoden zurück; beim biologischen Test lassen sich gewisse Interferenzen mit anderen Wirkstoffen, besonders dem Serotonin, kaum vermeiden. Man kann heute dahin zusammenfassen, daß bei Prüfung des Gesamt-Histamingehaltes nach lokaler Irritation der Haut zunächst keine Veränderung, nach 10—25 min eine Abnahme festzustellen ist (NILZÉN), während bei Prüfung des sog. freien Histamins schon innerhalb von Sekunden ein Anstieg der Werte gefunden werden kann (SCHAYER).

Ein bedeutender Schritt im forensischen Bereich war der Nachweis einer Vermehrung des freien Histamins im Bereich der Strangfurche bei Erhängen durch FAZEKAS und VIRÁGOS-KIS (1965). Wir haben diese bisher früheste vitale Reaktion auch bei anderen Verletzungen an der Leichenhaut nachweisen können (BERG, 1966) und möchten heute über das Verhalten der Gewebskonzentrationen von Histamin und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) im Wundgebiet bei längeren Überlebenszeiten berichten.

---

\* Die Hauptergebnisse wurden vorgetragen auf der Tagung der internationalen Akademie für gerichtliche Medizin in Budapest, Oktober 1967.

Im folgenden ist zunächst das methodische Vorgehen ausführlich dargestellt, weil die Originalverfahren, um optimale Reproduzierbarkeit zu erreichen, in einigen Punkten modifiziert werden mußten.

## Methodik

### 1. Extraktion

Da für die forensische Praxis der Nachweis reaktiv freigesetzten oder neugebildeten Histamins in der Frühphase am wichtigsten ist, haben wir unsere Untersuchungen auf die schonende Extraktion mit physiologischen Lösungen („freies Histamin“) abgestellt. Die Hautanteile der zu untersuchenden Wunde, Wundfläche oder eines Teiles derselben werden in  $\frac{1}{2}$ –1 cm Abstand vom Wundrand ausgeschnitten und mit der Schere von Fettgewebe befreit. Mindestens 1,5–2,0 g Haut (Feuchtgewicht) werden eingewogen, mit der Schere etwas zerkleinert und mit der fünffachen Menge physiologischer Kochsalzlösung (wenn vergleichende Auswertung am biologischen Präparat erfolgen soll) oder 0,1 n HCl bei  $+4^{\circ}\text{C}$  unter gelegentlichem Umschwenken über 16–18 Std extrahiert. Anschließend filtriert man den Ansatz und mißt die verbleibende Extraktflüssigkeit.

### 2. Histamin-Bestimmung nach SHORE, BURKHALTER und COHN

Da die Genauigkeit und Spezifität des biologischen Histamin-Nachweises am überlebenden Meerschweinchendarm in manchen Punkten doch anfechtbar sind, haben wir den Bestimmungen das moderne, quantitativ genauere und insgesamt auch empfindlichere fluorimetrische Meßverfahren zugrunde gelegt. 5 ml Extrakt werden mit 0,25 ml konz. Perchlorsäure je 10 min geschüttelt und zentrifugiert (diese und die folgenden Zentrifugierzeiten sollten möglichst gleichmäßig und nicht zu knapp gehalten sein, jeweils ca. 10 min). 4 ml der überstehenden Flüssigkeit werden mit 10 ml n-Butanol (rein für Chromatographie Riedel de Haen) zusammen mit 1,5 g NaCl und 0,5 ml 5 n NaOH je 10 min geschüttelt und zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird abgesaugt und verworfen, die Butanol-Phase mit 5 ml NaCl-gesättigter 0,1 n NaOH gewaschen und zentrifugiert. 8 ml der Butanol-Phase werden mit 15 ml Heptan (Mercks n-Heptan für Spektroskopie) und 4,5 ml 0,1 n HCl je 10 min geschüttelt und zentrifugiert; die wäßrige Phase teilt man in 2 Teile zu je 2 ml. Teil A wird zur Bestimmung mit 0,4 ml n NaOH und 0,1 ml OTP-Reagens gemischt (Ortho-Phtaldialdehyd, z. B. der EGA-Chemie, Steinheim, 1 %ig in Methanol p.a. 2 Wochen haltbar); nach  $3\frac{1}{2}$  min ( $\pm\frac{1}{2}$  min) 0,2 ml 3 n HCl zur Stabilisierung des Fluorophors zufügen. Die Kondensation des Histamins mit OTP bewirkt eine ungewöhnlich starke Fluoreszenz mit charakteristischem Spektrum; sie ist sehr spezifisch. Teil B wird als Blanc ebenso behandelt wie A, nur wird zuerst die Salzsäure und dann erst das OTP-Reagens zugesetzt (die Kondensation findet im sauren Milieu nicht statt). Die Messung erfolgt im Spektralphotofluorometer von Zeiss M 4 Q III, Anregung bei 355 m $\mu$ , Emission bei 450 m $\mu$ . Die Strahlung der Xenonlampe führt jedoch zu einer raschen Zerstörung des Fluorophors schon während der Ablesung; daher zogen wir die Quecksilberdampfampe des PMQII-Gerätes mit Filter M 365 vor. Der Blanc-Wert ist von dem Ergebnis der Probe A abzuziehen. Für die Eichkurve verwendet man Histamin-Verdünnungen in 0,1 n HCl von 0,1–3  $\gamma$ /ml. Der aus der Eichkurve abgelesene Meßwert in  $\gamma$  wird mit der ml-Zahl des Extraktes multipliziert und durch die eingewogene Hautmenge in g dividiert. Die Verluste während des Extraktionsganges sind geringer, wenn die

Schüttelzeiten des Originalverfahrens (5, 5, 1 min) in der oben angegebenen Weise auf je 10 min verlängert werden; sie betragen — jedenfalls bei der Schüttelleistung des Kolbenschüttlers von Baird u. Tatlock/London — nur noch 20—30%. Man liest das Ergebnis am besten gleich an einer solchen „Recovery-Eichkurve“ ab (Abb. 1). — Bei genügender Einübung schwanken die Ergebnisse von Mehrfachbestimmungen um durchschnittlich 5%.

### 3. Biologische Histamin-Bestimmung

am überlebenden Meerschweinchen nach MAGNUS; Einzelheiten der Technik vgl. BERG (1948) sowie FAZEKAS und VIRAGOS-KIS.

### 4. Serotonin-Bestimmung nach UDENFRIEND et al.

3 ml Extrakt werden mit wasserfreiem Natriumcarbonat auf pH 10 gebracht, sodann mit 5 ml Boratpuffer folgender Zusammensetzung vereinigt: 21,98 g Borsäure in 700 ml H<sub>2</sub>O lösen, 38,5 ml 10 n NaOH zufügen, mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen; die Mischung mit n-Butanol und NaCl übersättigen und schütteln, überstehendes Butanol absaugen; End-pH soll annähernd bei 10 liegen. — Der

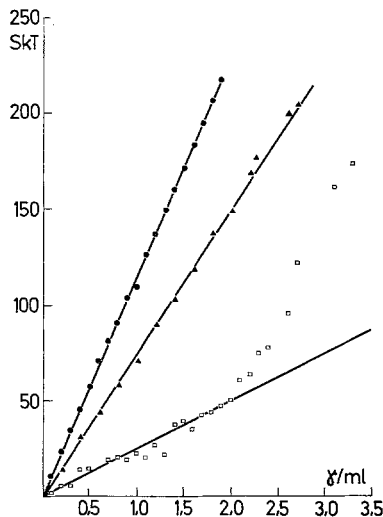


Abb. 1

Abb. 1. Fluorimetrische Histamin-Bestimmung nach SHORE, BURKHALTER und COHN. ●—● Eichkurve aus Histamin-HCl-Lösung; □—□ Recovery-Quoten aus wäßriger Histamin-Lösung, Originalverfahren; ▲—▲ Recovery-Quoten aus wäßriger Histamin-Lösung, verlängerte Extraktionszeiten

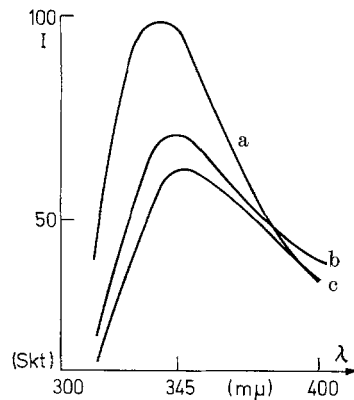


Abb. 2

Abb. 2. Fluoreszenzspektren von handelsüblichem Serotonin-Kreatininsulfat in n/10 HCl (a), Hautextrakt nach UDENFRIEND von Mensch (b) und Meerschweinchen (c), jeweils bei pH 2,5

im alkalischen gepufferte Extrakt wird mit 7 ml Aqua dest., 5 g NaCl und 15 ml n-Butanol 10 min geschüttelt und 10 min zentrifugiert, die wäßrige Phase verworfen. 14 ml der Butanol-Phase werden mit der gleichen Menge Boratpuffer versetzt und nochmals geschüttelt und zentrifugiert. 10 ml der auf diese Weise

gewaschenen Butanol-Phase werden mit 20 ml Heptan und 3 ml n/10 HCl 10 min geschüttelt und zentrifugiert. 3 ml der wäßrigen Phase werden mit wasserfreiem Natriumcarbonat auf pH 2,5 gebracht und im Spektralfluorimeter, unter Anregung mit der Xenonlampe bei 295 m $\mu$ , bei 345 m $\mu$  gemessen. Zur Herstellung der Eichkurven wird Serotonin(-Kreatininsulfat) in n/10 HCl gelöst; die Substanz selbst fluoresciert unter den angegebenen Bedingungen stark genug, um Konzentrationen ab 0,02  $\gamma$ /ml einwandfrei messen zu können. Die Wahl dieser Wellenlänge als optimal für die Emissionsmessung ergab sich aus der leichten Verschiebung des Intensitäts-Maximums in Hautextrakten gegenüber der Bezugssubstanz (Abb. 2), ferner wegen der größeren Empfindlichkeit gegenüber der — allerdings spezifischeren — Messung bei 550 m $\mu$ . Die Recovery aus wäßrigen Gewebsextrakten liegt hier, schlechter als bei Histamin, zwischen 20 und 30%; auch hier führt die Aufstellung einer „Recovery-Eichkurve“ zu genauer reproduzierbaren Werten als die Multiplikation von Werten, die aus der mit Standardlösungen hergestellten „Normal-Eichkurve“ abgelesen werden.

## Ergebnisse

### 1. Histamin

Die Histamin-Bestimmung in Hautwunden setzt die Aufrechnung der Werte gegen unverletzte Vergleichshaut voraus. Diese muß an der menschlichen Leiche jedenfalls von der gleichen Körperregion des gleichen Falles entnommen werden, von dem auch das Wundgewebe stammt, da die individuelle und regionale Varianz des Histamin-Gehaltes sehr groß ist (Tabelle 1) und außerdem nach FAZEKAS (1967) die Leichenzeit von Einfluß auf das freie Histamin ist. Die Hauptunterschiede finden sich von Person zu Person, im übrigen zwischen behaarten und unbehaarten Hautpartien (weitere Befunde bei VUGMAN u. ROCHA E SILVA sowie FAZEKAS u. VIRAGOS-KIS, 1967). Manchmal ist man gezwungen, ein korrespondierendes Hautstück kontralateral zu entnehmen; mit

Tabelle 1. *Histamin-Gehalt der Leichenhaut, regionale und individuelle Varianz*

Körperregionen	in $\gamma$ /g Gewebe								Mittelwert	s
Kopfhaut, Kinn ♂, Achselhöhle	28,8	24,7	14,6	11,9	6,3	2,9	1,1	12,9	10,6	
Hals	13,7	8,0	6,7	5,3	2,5	1,3	1,1	5,5	4,5	
Brust	11,7	10,8	9,3	8,4	1,0	0,7	0,6	6,0	3,3	
Bauch	9,3	8,9	8,9	2,3	0,2			5,9	4,3	
Rücken	15,0	13,1	8,1	7,1				10,8	3,8	
Arm	15,8	12,6	12,0	10,5	10,3	9,3	9,3	8,8	4,3	
	8,6	8,4	8,0	7,3	4,6	4,4	0,1	0,1		
Bein	18,3	15,0	11,9	10,1	9,7	6,2	5,8	7,9	6,1	
	1,7	0,8	0,2							

Tabelle 2. *Histamingehalt der Haut in  $\gamma/g$ , Seitenvergleich korrespondierender Stellen*

Körperregion	Fall	re.	li.	Fall	re.	li.
	65			59		
Hals		8,4	9,5			
Nacken		11,9	9,9			
Brust		8,0	8,0		9,3	8,4
Oberarm		5,5	6,7		12,4	11,9
Unterarm		8,4	8,3		12,2	10,8
Oberschenkel		8,0	8,5		9,7	7,3
Unterschenkel		6,7	6,6		10,1	9,1
	61			81		
Kopfschwarte		0,9	1,1		14,7	
Kinn		0,9	0,8		17,2	
Unterarm		0,1	0,1		8,2	10,5
Oberschenkel		0,2	0,3		6,2	
	71					
Unterarm:						Maximal- differenz:
Beugeseite		11,3	10,4			2,3 $\gamma/g$
Streckseite		13,2	12,9			

kleinen Seitendifferenzen muß man hierbei wohl rechnen (Tabelle 2), auch dorsoventral können Abweichungen bestehen.

Den Einfluß des Wundalters haben wir zunächst im Tierversuch geprüft. Bei 52 Meerschweinchen wurde in Narkose jeweils ein 3 cm langer Hautschnitt auf der einen Rückenseite angelegt; die Tiere wurden nach unterschiedlich langer Überlebenszeit getötet und die Differenz des Histamin-Gehaltes gegenüber der unverletzten Seite bestimmt (Abb. 3). Obwohl die meisten so gewonnenen Werte größenordnungsmäßig die übliche Seitendifferenz nicht übersteigen, ist die Tendenz zur Ausbildung von mindestens 2 positiven und 1 negativen Phase im Verlauf der Wundheilung unverkennbar. Die Zusammenstellung unserer bisherigen Werte aus menschlichem Material läßt ähnliche Verhältnisse vermuten (Abb. 4). Es handelt sich um alle möglichen Hautverletzungen, meist Abschürfungen, Quetsch- und Platzwunden mit verschiedenen langer Überlebenszeit. Die p.m. Liegezeit der Leichen bis zur Materialentnahme schwankt zwischen 8 Std und 3 Tagen. Man kann sagen, daß gut die Hälfte aller sofort tödlichen oder nur ganz kurz überlebten Fälle eine deutliche Erhöhung des Histamin-Gehaltes gezeigt hat; diese Gruppe enthält u.a. fünf Erhängungsstrangfurchen. In der 2.—4. Std fand sich meist eine Verminderung des Histamin-Gehaltes der Wundränder gegenüber der Vergleichshaut, einzelne positive Werte treten wieder zwischen der 6. und 24. Std auf. Damit scheint der phasische

Verlauf der Histamin-Freisetzung beim Menschen etwas langsamer vor sich zu gehen als beim Meerschweinchen.

An postmortal gesetzten Wunden (bei Meerschweinchen 5 min bis 6 Std p.m., an menschlichem Material ab 8 Std p.m.) wurde kein Histamin-Anstieg beobachtet.

Bei alledem fällt auf, daß unsere fluorimetrisch gewonnenen Histamin-Werte in der Mehrzahl der Fälle doch deutlich niedriger liegen als

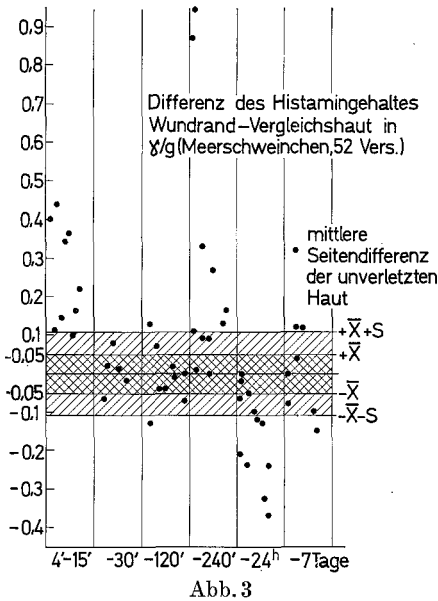


Abb. 3

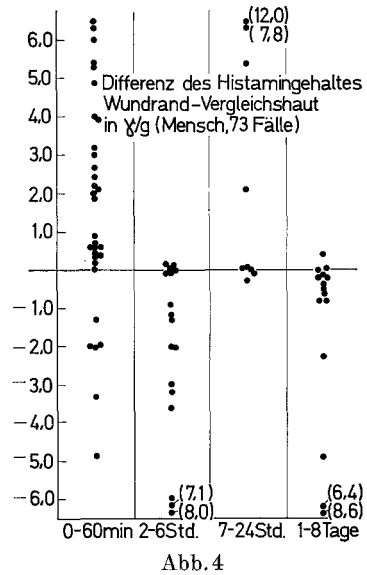


Abb. 4

Abb. 3. Differenz des Histamin-Gehaltes Wundrand-Vergleichshaut in  $\gamma/g$  (Ordinate); an der Abszisse sind die im Einzelfall erreichten Überlebenszeiten nach der Verletzung in Kategorien aufgetragen, welche gegen Ende der Skala eine starke Raffung bewirken

Abb. 4. Differenz des Histamingehaltes Wundrand-Vergleichshaut in  $\gamma/g$  (Mensch, 73 Fälle); im übrigen wie Abb. 3

die von FAZEKAS und VIRÁGOS-KIS mit der biologischen Methode am ungereinigten Extrakt gemessenen Zuwachsraten. Die Simultan-Bestimmung nach beiden Methoden in einer Reihe von Fällen (Tabelle 3) ergab im Magnusschen Versuch nicht grundsätzlich, aber doch in der Regel höhere Werte für die Wundhaut, z. T. auch für die Vergleichshaut. Nach den einschlägigen Ergebnissen der Versuche mit Histamin-Releasern haben wir angenommen, daß als weiterer glattmuskulär erregender (und mikrozirkulatorisch wirksamer) Stoff bei lokaler Hautirritation 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) freigesetzt wird.

Tabelle 3. *Methodologisch vergleichende Histaminbestimmung*

Fall Nr.	Wundart und Lokalisation	Wund- alter	Histamingehalt in $\gamma/g$ (Doppelbestimmungen)	
			fluori- metrisch	biologisch
O 136	Abschürfung, Ellbogen	0	1,1	9,1
	Vergleichshaut	—	7,3	7,2
O 134	Abschürfung, Hals	4 Std	8,9	12,6
	Vergleichshaut	—	1,1	7,4
	Abschürfung, Rücken		4,9	10,1
	Vergleichshaut		7,1	6,6
	Abschürfung, Brustwarzen		7,2	6,7
	Vergleichshaut		8,2	7,7
P 555	Operationswunde, Hals	5 Std	12,8	7,8
	Vergleichshaut	—	10,8	9,1
P 725	Operationswunde, Thorax	2 Tage	5,3	4,2
	Vergleichshaut	—	11,7	6,0
O 133	Quetschwunde, Bein	3 Tage	0,6	3,6
	Vergleichshaut	—	0,8	1,8
	Quetschwunde, Arm		3,6	1,7
	Vergleichshaut		4,3	1,6
O 135	Trachetomiewunde	8 Tage	1,1	6,6
	Vergleichshaut	—	1,4	8,5

## 2. Serotonin

Eine zur Bestimmung des Serotonin-Gehaltes in verschiedenen Stadien der Wundheilung durchgeführte analoge Tierversuchsreihe (Schnittverletzungen der Rückenhaut; 71 Versuche mit Überlebenszeiten zwischen 1 min und 8 Tagen) zeigte in fast allen Fällen eine signifikante Zunahme des 5-HT-Gehaltes in den Wundrändern und mit fortschreitendem Wundalter wiederum einen mehrphasischen Verlauf (Abb. 5). Interessant ist das Zusammenfallen des zweiten Maximums der Mittel-

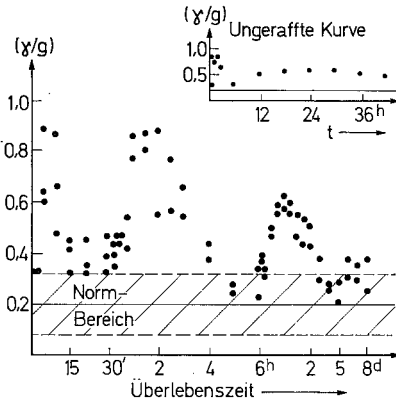


Abb. 5. 5-Hydroxytryptamin in Meerschweinchenhaut nach Schnittverletzung (71 Vers.). Die Werte sind bezogen auf S.-Kreatininsulfat; der reine 5-HT-Gehalt beträgt jeweils rd. 45%. Sie sind nicht als Differenz gegenüber der Vergleichshaut aufgerechnet, deren Werte in die schraffierte Fläche eingehen („Normbereich“ = unverletzte Haut;  $\bar{x} = 0,20 \gamma/g$ ;  $3s = 0,12$ ;  $N = 71$ )

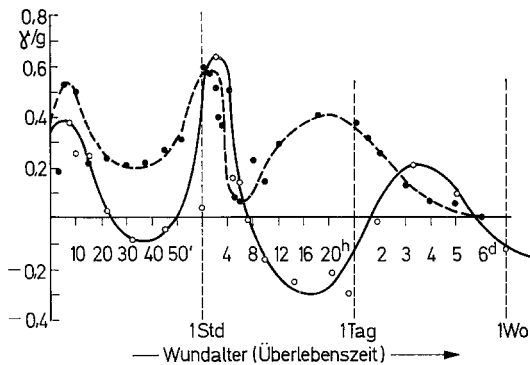


Abb. 6. Mittelwert-Verlaufskurven des Histamin- (—○—) und Serotonin- (---●---) Gehaltes der Wundränder von Schnittwunden (jeweils Differenz gegenüber der unverletzten Vergleichshaut) aus Abb. 3 und 5

wert-Verlaufskurven von Histamin und Serotonin um die 4. Std (Abb. 6). Um diese Zeit findet man ja histologisch auch schon eine deutliche Anwanderung von Makrophagen; bei der Ratte handelt es sich im wesentlichen um Mastzellen, deren Entspeicherung sich mit der Aminopeptidase-Färbung (SCHAUER) deutlich darstellen läßt (Abb. 7 und 8).

In der unverletzten menschlichen Leichenhaut fanden sich, im Gegensatz zu den stark variierenden Histaminkonzentrationen, sowohl regional



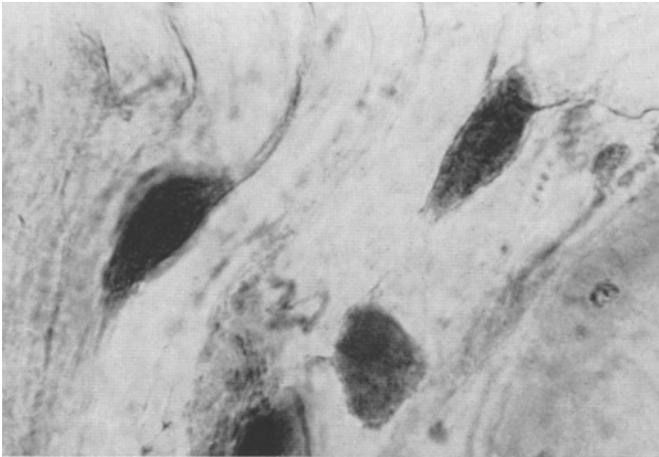


Abb. 7. Ruhende Mastzellen in der Subcutis der Rattenhaut, Leucaminopeptidase-Färbung

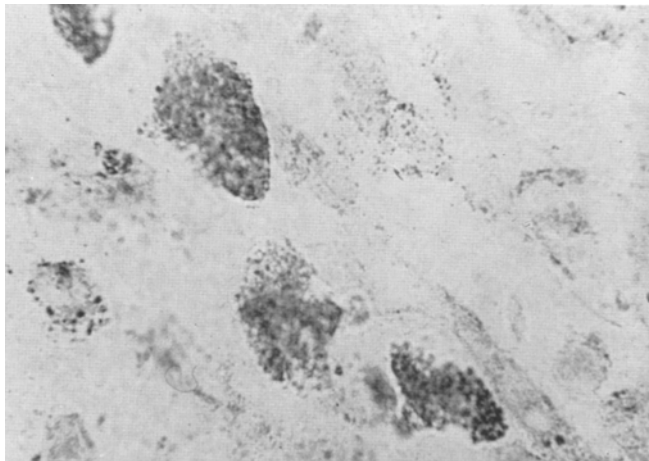


Abb. 8. Entspeicherte Mastzellen im Wundbett einer 6 Std überlebten Schnittverletzung der Rattenhaut, Färbung wie in Abb. 7

als auch individuell nur wenig streuende Serotoninwerte zwischen 0,3 und 0,6  $\gamma$ /g. Die wenigen, uns bisher vorliegenden Serotonin-Werte aus menschlicher Wundhaut scheinen mit dem Phasenrhythmus der Meer-schweinchen-Versuche besser übereinzustimmen, als dies für die Histamin-Reihe festgestellt werden konnte (Abb. 9). Bei der Aufrechnung der 5-HT-Gehalte im Wundgebiet gegen die Vergleichshaut traten „negative“

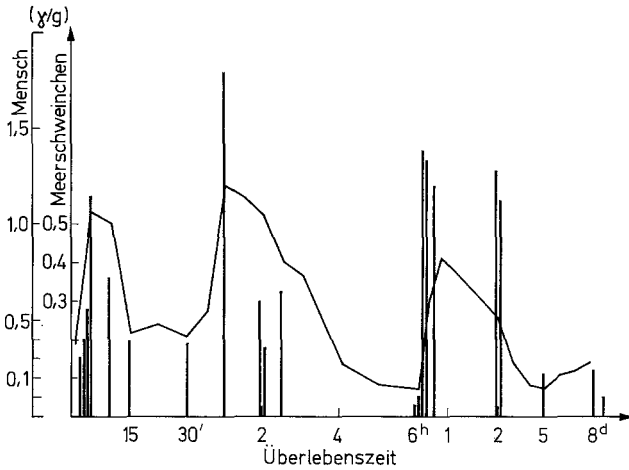


Abb. 9. Serotonin-Zuwachs (Werte wiederum auf S.-Kreatininsulfat bezogen) in menschlicher (Säulen) und in Meerschweinchenhaut (Kurve) nach mechanischer Verletzung. Die Werte der Meerschweinchen-Reihe sind aus zeitlich zusammengefaßten Gruppen von Meßpunkten der Abb. 5 gemittelt; alle Einzelwerte (auch für Leichenhaut) sind gegen die Vergleichshaut-Werte aufgerechnet

Werte, also eine Verminderung des Ausgangs-Gewebsspiegels wie beim Histamin, nicht auf. Auch hier fehlte an postmortal gesetzten Wunden eine Vermehrung des 5-HT-Gehaltes.

### Diskussion

Aus unseren Untersuchungen ergibt sich zunächst — in Übereinstimmung mit den Befunden von HUKOVIĆ et al. —, daß es grundsätzlich möglich ist, in der Leichenhaut unterschiedliche, auf den Vitalzustand beziehbare Histamin-Konzentrationen festzustellen. Schon die Tatsache, daß regelmäßige Differenzen des Histamin-Gehaltes zwischen den Wundrändern vitaler Verletzungen und dem Gewebe unverletzter Vergleichshaut bestehen, zeigt im Verein mit dem Befund hoher Histamin-Werte unabhängig von der zwischen 8 Std und 3 Tagen schwankenden postmortalen Liegezeit, daß in der Haut vital gebildetes bzw. gespeichertes Histamin auch an der Leiche noch nach Stunden und Tagen wenigstens z.T. nachweisbar bleibt. Das von uns an einem genügend großen Material angewendete Differenzverfahren, das unter sonst identischen Bedingungen das alterierte Gewebe mit unverletztem Material derselben Region vergleicht, genügt auch der Forderung von LINDELL und WESTLING, die mit Recht auf die Irrtümer hinweisen, welche durch fermentativen Abbau des Histamins in Einzelproben während des Untersuchungsganges entstehen können.

Physiologen und Biochemiker begegnen der Mitteilung von Aminbefunden an der Leiche meist mit einer gewissen Zurückhaltung, weil sie gewohnt sind, mit lebensfrischem Material zu arbeiten, und von der Vorstellung ausgehen, daß an der Leiche supravital wirksame Fermente den mehr oder weniger schnellen Abbau empfindlicher Wirkstoffe, wie sie das Histamin und auch die Katecholamine sind, herbeiführen müßten, oder daß durch autolytische bzw. bakterielle Vorgänge postmortale Neubildungen stattfinden könnten. Daß in der Tat die postmortale Autolyse zu einer langsamen Zunahme des freien Histamins in der Leichenhaut, etwa von der 30. Std ab deutlich werdend, führt, haben neuerdings FAZEKAS u. VIRAGOS-KIS (1967) gezeigt.

Über etwaige p.m. Histamin-Verluste liegen noch keine Befunde vor. Histamin wird überwiegend durch eine Diaminoxidase abgebaut, deren Aktivität in der Haut aber gering und außerdem O<sub>2</sub>- und temperaturabhängig ist: 1 g Frischhaut vermag unter optimalen Bedingungen — das ist bei 37°C unter Sauerstoff geschüttelt — in 12 Std etwa 10  $\gamma$  Histamin zu inaktivieren (STÜTTGEN). Für die Leichenhaut sind also die Voraussetzungen für ein postmortales Erhaltenbleiben vital oder agonal freigesetzter Histaminquanten bis zu einem gewissen Grade gegeben, da ja die Temperatur in der Regel ziemlich schnell absinkt und die Sauerstoffdiffusion in die unteren Hautschichten nur gering ist. Der Histamin-Gehalt einer Wunde, den wir nach einer Leichenzeit von 24 bis 48 Std vorfinden, dürfte somit — je nach der Abkühlungsgeschwindigkeit der betreffenden Körperregion — überschläglich noch mindestens die Hälfte des Ausgangswertes betragen; diesbezügliche Untersuchungen sind noch im Gange.

Weiterhin bestätigen unsere Ergebnisse die grundlegende Feststellung von FAZEKAS, daß im Bereich vitaler Erhängungsstrangfurchen der Histamin-Gehalt der Cutis signifikant vermehrt ist. Da wir eine starke Erhöhung gegenüber der Vergleichshaut auch bei anderen, nur um wenige Minuten überlebten Hautverletzungen, wie Abschürfungen, Schnitt- und Platzwunden fast stets fanden, sind wir trotz des zahlenmäßig noch beschränkten Materials der Meinung, daß es sich hier um einen *Regelmechanismus* handelt, der als *frühe humorale Vitalreaktion der Haut auf Traumatisierung* von größter Bedeutung für die forensische Diagnostik ist.

Da die relevanten Befunde immer aus einer erheblichen Differenz der Werte zwischen Wundhaut und Vergleichshaut resultieren und der Histamin-Gehalt der Wundränder vielfach auch niedriger ist als in der Vergleichshaut, scheint erwiesen, daß eine mehr oder weniger ausgeprägte postmortal-autolytische Vermehrung des Gewebespiegels an freiem Histamin für diese Befunde, wenigstens in den ersten 2—3 Tagen der

Leichenzeit, ohne Bedeutung bleibt. Ein Vergleich der Werte mit der jeweiligen postmortalen Liegezeit zeigte auch, daß oft hohe Werte mit niedrigen Leichenzeiten korrespondieren und umgekehrt. Allgemein machten wir die Erfahrung, daß erst beim Einsetzen deutlicher Fäulniserscheinungen mit Grünfärbung der Haut gelegentlich Histamin-Werte auftreten, welche die normale Variationsbreite der Werte für die betreffende Körperregion übersteigen, was sich mit früheren Ergebnissen hinsichtlich des Histamin-Spiegels im Leichenblut deckt (LAVES und BERG).

Die Verfolgung des Histamin-Gehaltes der Wundränder über längere Perioden des Heilungsprozesses im Tierversuch führt in Erweiterung der Befunde von NILZÉN zu der Erkenntnis, daß der anfänglichen „positiven Histaminphase“ regelmäßig eine „negative Phase“ folgt, innerhalb welcher der Histamin-Gehalt der umgebenden Haut größer ist als im Wundgebiet. Daß sich der nach den Tierversuchen anzunehmende dreiphasische Verlauf auch in der Serotonin-Reihe wiederfindet, macht die Vermutung einer Gesetzmäßigkeit im Verlauf der Wundheilung noch wahrscheinlicher. Die Deutung der geschilderten Befunde auf der Grundlage dessen, was bisher über die Physiologie des Histamins und 5-HT bekannt ist, fiel nicht schwer, wenn man es nur mit der zweiten positiven Phase zu tun hätte, in der die Histamin- und Serotonin-Kurven übereinstimmen. In jedem Fall wird ein wesentlicher Anteil der Befunde durch primäre Entspeicherung und sekundären Antransport der Wirkstoffe durch hämatogene und histiogene Wanderzellen zu erklären sein, wenn man die hierzu vorliegenden experimentellen Befunde (SANYAL u. WEST u.a.) berücksichtigt. Interessant ist das Zusammenfallen des 3. Histamin-Maximums mit der Prävalenz-Phase mononucleärer Elemente im Wundbereich, nachdem CRAPS et al. zeigen konnten, daß Lymphocyten gegenüber neutrophilen polymorphkernigen Leukocyten einen 6—10fach höheren Histamingehalt aufweisen.

Der vielfach sehr starke lokale Zuwachs an freiem Histamin innerhalb weniger Minuten gleich nach der Wundsetzung läßt allerdings die Annahme eines rein cellulären Entspeicherungsmechanismus (RILEY und WEST) weniger befriedigend erscheinen, wenigstens für das menschliche Material. Es könnte sich hier z.T. um ein von SCHAYER (1961) im Gegensatz zum präformierten Gewebs-Histamin sog. „induced histamine“ handeln, welches ad hoc durch eine „aktivierbare“ Form der Histidin-decarboxylase gebildet werden soll. Das Ferment soll durch lokale Irritation des Gewebes oder „systemic stresses“, welche zu Freisetzung von Katecholaminen und Vasoconstriction führen, so rasch aktiviert werden, daß über die Histaminsynthese ein Einfluß auf die mikrozirkulatorischen Verhältnisse im Gewebe möglich ist (SCHAYER, 1962). Auch in diesem Zusammenhang erscheinen weitere Untersuchungen angebracht.

Die Bedeutung des mehrphasischen Verlaufs der Wund-Histamin- und Serotonin-Konzentration, dessen angedeutete Gesetzmäßigkeit freilich noch an einem größeren Material erhärtet werden muß, für die forensische Vitalitäts- und Altersbestimmung von Wunden liegt auf der Hand: Der positive Histamin-Befund mit einer Vermehrung von über 2—3  $\gamma/g$  gegenüber der unverletzten Haut der gleichen Körperregion gestattet nach den bisherigen Ergebnissen wohl die Bewertung als beweiskräftige Vitalreaktion; der Umkehrschluß, daß eine Wunde mit fehlender Histamin-Bildung als postmortal angesehen werden könnte, erscheint unzulässig, weil schon bei Überlebenszeiten von 20 min an sicher vitale Verletzungen ohne Histamin-Überschuß vorkommen. Die gleiche Einschränkung wird man — zunächst theoretisch, weil wir erst über einen einschlägigen Fall verfügen — auch für Untersuchungsobjekte von Schwangeren und Neugeborenen machen müssen, weil bekanntlich während der Gravidität eine sehr erhebliche Steigerung der Diaminoxidase-Aktivität vorliegt; die Möglichkeit, daß bei solchen Leichen im Wundgebiet freigesetzte Histaminquanten p.m. rascher abgebaut werden könnten, ist nicht von der Hand zu weisen.

Eine andere Frage ist, ob auch ein hohes Histamin-Defizit im Wundgebiet als vitale Reaktion gewertet werden kann. Da der „Verbrauch“ bzw. Abtransport freigesetzten Histamins im Sinne der Befunde von NILZÉN unter physiologischen Verhältnissen eine intakte Zirkulation voraussetzt, neigen wir dazu, auch diese Frage zu bejahen, allerdings mit der Einschränkung, daß nicht etwa besondere Verhältnisse (z.B. Auswässerung der Wunde bei Wasserleichen etc.) zu einer Veränderung des agonalen Status geführt haben. Besonders wichtig wären diese Befunde wohl für die Zeit um die ersten Stunden nach der Verwundung, in denen sichere morphologische und histochemische Reaktionen beim Menschen noch nicht zu erheben sind (WAGENER).

In zwei Fällen sahen wir ein hohes Histamin-Defizit bei rasch tödlichen Schußverletzungen. Diese Fälle bilden zusammen mit einigen thermischen Wunden die kleine Gruppe negativer Werte innerhalb der Verletzungen mit kurzer Agonie (0—60 min) der Abb. 3. Es ist daran zu denken, daß hier vielleicht lokale Hitzewirkung oder chemische Gewebsalteration durch beim Nahschuß miteindringende Pulvergase eine Rolle spielen.

In der zweiten positiven und der zweiten negativen Histaminphase wird in der Regel auch bereits ein entsprechender histologischer Befund die Überlebenszeit der Verletzung charakterisieren.

Nach den bisher noch wenig umfangreichen Serotonin-Befunden hat man den Eindruck, daß dieser Wirkstoff nach entsprechender Erweiterung der Erfahrungen an menschlichem Material eine ähnliche, wenn

nicht größere Bedeutung für den Vitalitäts-Nachweis von Hautverletzungen gewinnen könnte, wie dies für das Histamin schon heute gesagt werden kann. Die Unterschiede im Verlauf des 5-HT-Gewebsspiegels, der im Gegensatz zum freien Histamin in den Spätphasen der Wundheilung anhaltend erhöht zu sein scheint, lassen daran denken, daß dem Serotonin über den möglichen mikrozirkulatorischen Früheffekt, welcher es als lokal gefäßerweiterndes und permeabilitätssteigerndes „Gewebshormon“ an die Seite des Histamins stellt, hinaus noch andere Aufgaben in der biochemischen Steuerung reparativer Vorgänge (Bindegewebsaktivierung? — vgl. den von FEYRTER postulierten, von ERSPAMER nachgewiesenen „Fibrosierungseffekt“) zukommen könnten.

Das Differieren der Verlaufskurven von Histamin und 5-HT legt in forensischer Beziehung auch den Gedanken nahe, durch Parallelbestimmung beider Wirkstoffe zu einer biochemischen Charakterisierung des aktuellen Heilungsstadiums zu gelangen. Es erscheint vorstellbar, nach entsprechender Vertiefung der bisherigen Erfahrungen durch bestimmte Befundkombinationen — z. B. positiver Serotonin-, negativer Histaminwert bei noch fehlender Zellreaktion um das Ende der ersten Stunde — über den bloßen Nachweis der vitalen Reaktion hinaus eine nähere Aussage über das Wundalter zu treffen, als dies bisher möglich war.

### Zusammenfassung

Der Histamin- und 5-Hydroxytryptamin-Gehalt der Haut im Wundgebiet nach mechanischer Verletzung wurde mit fluorimetrischer Methodik im Tierversuch und an menschlichem Leichenmaterial geprüft. Schon in den ersten Minuten nach der Wundentstehung fand sich in der Regel eine signifikante Vermehrung sowohl des freien Histamins als auch des Serotonins gegenüber der unverletzten Vergleichshaut. Die Konzentration zeigt im weiteren Verlauf der Wundheilung einen phasenhaften Verlauf insofern, als die Werte nach anfänglichem Absinken bis zur oder unter die Norm späterhin zwei weitere Maxima erreichen. Deren erstes fällt um die 4.—6. Std zusammen mit der Immigration hämatogener Wanderzellen, deren Entspeicherung mit Hilfe der Aminopeptidasefärbung gut darstellbar ist. Sowohl die Wirkstoffvermehrung als auch das Defizit können unter geeigneten Voraussetzungen als vitale Reaktion gelten. Darüber hinaus erscheint es vorstellbar, durch bestimmte Befundkombinationen, auch im Zusammenhang mit morphologischen Kriterien, eine nähere Aussage über das Wundalter zu treffen, als dies bisher möglich war.

### Summary

The concentration of histamine and 5-hydroxytryptamine in skin wounds of huinea pigs and human corpses were determined by means

of the fluorometric methods by SHORE and UDENFRIEND. The proceedings for getting material, of extraction and measurement were standardized so that it was possible to reproduce the results with an sufficient degree of accuracy. In this connection a comparison was performed between pharmacological and biochemical determination of histamine in skin wound extracts, also concerning the different areas of human body and the postmortal turn of the substances.

A significant increase of both — free histamine and serotonin — in correlation to unhurt skin was regularly observed already during the first minutes after wounding. In the further course of wound healing process phases of variable concentrations appeared: after an initial decrease to normal or even to subnormal values they reached two further maxima. The first of them — about 4—6 hours after wounding — coincides with the immigration of mast cells respectively macrophages, whose disruption and depletion in the damaged tissue is shown by aminopeptidase staining. Under suitable conditions the increase of histamine and serotonin as well as the decrease may be considered to be a vital reaction. Moreover it seems possible to gain more distinct statements about the age of wounds by correlating the results of several biochemical and morphological investigations.

#### Literatur

- BERG, S.: Diaminoxidase-Bestimmung bei Spurenuntersuchungen. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **39**, 89 (1948).
- CRAPS, L., u. Z. Inderbitzin: Histamine cutanée et réactions inflammatoires. Arch. belges Derm. **13**, 1 (1957).
- ERSPAMER, V.: Recent research in the field of 5-Hydroxytryptamine etc. Fortschr. Arzneimittel-Forsch. **3**, 151 (1961).
- FAZEKAS, J. G., u. E. VIRÁGOS-KIS: Der Gehalt der Erhängungsfurche an freiem Histamin als vitale Reaktion. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **56**, 250 (1965).
- Über den Gehalt der menschlichen Haut verschiedener Körperregionen an freiem und Gesamt-Histamin. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **61**, 107 (1967).
- FELDBERG, W., and A. LOESER: Histamine content of human skin in different clinical disorders. J. Physiol. (Lond.) **126**, 286 (1954).
- FEYRTER, F.: Zur Pathologie und Klinik des Darmkarzinoides. Dtsch. med. Wschr. **81**, 1073 (1956).
- HUKOVIĆ, S., J. SPUŽIĆ u. P. STERN: Über die Übertragung des Schmerzempfindens in der Haut des Menschen. Arch. int. Pharmacodyn. **109**, 285 (1957).
- KÜHNAU, J.: Biochemie der Wundheilung. Langenbecks Arch. klin. Chir. **301**, 23 (1962).
- In: Wundheilung und Wundnaht. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1967.
- LAVES, W., u. S. BERG: Agonie; Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut. Lübeck: M. Schmidt-Römhild 1965.
- LINDELL, S. E., and H. WESTLING: Histamine metabolism in man. S. 734. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XVIII/1. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.

- LINDNER, J.: Die Morphologie der Wundheilung. Langenbecks Arch. klin. Chir. **301**, 39 (1962).  
— Vitale Reaktionen. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **60**, 312 (1967).
- MEIER, R.: Biochemische Kausalzusammenhänge des Entzündungsvorganges. In: Medizinische Grundlagenforschung. II. Hrsg. FR. K. BAUER. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- MENKIN, V.: Biochemical mechanisms in inflammation. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1956.
- NILZÉN, A.: Studies in histamine with special reference to the conditions obtaining in urticaria and related skin-changes. Acta derm.-venereol. (Stockh.) **27** Suppl. 17 (1947).
- PLOCH, W.: Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966.
- RAEKALLO, J.: Histochemical demonstration of enzymatic response to injury in experimental skin wounds. Exp. molec. Path. **4**, 303 (1965).  
— Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Lübeck: Schmidt-Römhild 1965.
- RILEY, J. F., and G. B. WEST: The occurrence of histamine in mast cells. S. 116. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XVIII/1. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- SANYAL, R. K., and G. B. WEST: The role of histamine and 5-HT in injury. Int. Arch. Allergy **26**, 362 (1965).
- SCHAUER, A.: Die Mastzelle. Stuttgart: G. Fischer 1964.
- SCHAYER, R. W.: Significance of induced synthesis of histamine in physiology and pathology. Chemotherapia **3**, 128 (1961).  
— Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system. Amer. J. Physiol. **202**, 66 (1962).
- SHORE, P. A., A. BURKHALTER, and V. A. COHN jr.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. exp. Ther. **127**, 182 (1959).
- STÜTTGEN, G.: Der fermentative Abbau von Tyramin, Histamin und Azetylcholin in den Schichten der menschlichen Haut. Arch. klin. exp. Derm. **201**, 564 (1955).
- UDENFRIEND, S.: Fluorescence assay in biology and medicine. New York: Academic Press 1962.  
— H. WEISSBACH, and C. T. CLARK: The estimation of 5-hydroxytryptamine (Serotonin) in biological tissues. J. biol. Chem. **215**, 337 (1955).
- VUGMAN, J., and M. ROCHA E SILVA: Biological determination of histamine in living tissues and body fluids. S. 81, in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 18, Teil I. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- WAGNER, T.: Altersbestimmung von Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Inaug.-Diss. Med. Göttingen 1968.

Professor Dr. S. BERG  
Institut für gerichtliche Medizin  
und Kriminalistik der Universität  
34 Göttingen, Geiststr. 7