

Zur Unterscheidung vitaler und postmortaler Wunden durch Bestimmung des Esterasemusters der Haut

RICHARD JARECKI, UWE ARNDT, CLAUS SCHULTZ und HANS KLEIN
Institut für gerichtliche Medizin (Abteilung Verkehrsmedizin: Prof. Dr. H. Klein)
der Universität Heidelberg

Eingegangen am 15. August 1969

Die Unterscheidung zwischen vitalen und postmortalen Wunden, seit jeher eine der wichtigsten Aufgaben der gerichtlichen Medizin, ist mit üblichen histologischen Methoden, sofern es sich nicht um ältere Wunden handelt, kaum möglich (Mueller, 1964; Gerin, 1965). Die Anwendung enzymatisch-histochemischer Methoden erbrachte wesentliche Fortschritte. Raekallio (1960, 1964) hat in vitalen Hautwunden für die histochemisch mit α -Naphthyl-acetat nachweisbaren Esterasen einen zentralen Bezirk mit abnehmender, einen peripheren mit zunehmender Enzymaktivität beschrieben. Zur Unterscheidung vitaler und postmortaler Wunden wurden mittels Discelektrophorese in Polyacrylamidgel vergleichende Untersuchungen an unverletzter, vital verletzter Haut mit unterschiedlicher Überlebenszeit nach der Verletzung sowie an postmortal verletzter Haut des Menschen durchgeführt.

Material und Methoden

1. *Elektrophorese.* Die aus Plexiglas gebaute Kammer unterschied sich von der üblichen Shandon-Kammer dadurch, daß die den Elektrodenpuffer enthaltenden Behälter auf 1 Liter vergrößert und so angeordnet waren, daß die Röhren zur Kühlung ganz in der Flüssigkeit eingetaucht standen. Es wurden 7 cm lange im inneren Durchmesser 0,5 cm breite Glasröhren benutzt. Stromquelle: Duostat D 2 Beckmann. Die Elektrophorese wurde mit 10 mA/Röhren begonnen. Die Auftrennung erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgel. Zur Durchführung erwies sich folgende Zusammensetzung geeignet: a) Für das Trenngel (Untergel) jeweils pro 100 ml Lösung:

Lösung 1:	1 N HCl	48,0 ml
	Tris	6,85 g pH 7,5
	Temed	0,46
Lösung 2:	Acrylamid	30 g
	Bis	0,4 g
Lösung 3:	Per	0,17 g
Lösung 4:	H ₂ O	

Diese Lösungen, im Verhältnis 1 Teil Lösung 1, 2 Teile Lösung 2, 4 Teile Lösung 3, 1 Teil Lösung 4, gemischt, ergeben ein Trenngel mit einem pH von 7,5 und eine Acrylamidkonzentration von 7,5%. Die Porengröße beträgt etwa 50 Å. Nach Ornstein u. Davis (1962) werden dadurch Proteine mit einem Molekulargewicht von 30—300000 aufgetrennt.

b) Für das Obergel jeweils 100 ml Lösung:

Lösung 5:	1 M H_3PO_4	39 ml
	Tris	4,95 g pH 5,5
	Temed	0,46 ml
Lösung 6:	Acrylamid	10,0 g
	Bis	2,5 g
Lösung 7:	Riboflavin	4,0 mg
Lösung 8:	Saccharose	40,0 g

Diese 4 Lösungen, im Verhältnis 1 Teil Lösung 5, 2 Teile Lösung 6, 1 Teil Lösung 7, 4 Teile Lösung 8 gemischt, ergeben ein Sammelgel mit einem pH von 5,5 und eine Acrylamidkonzentration von 2,5%. Als Elektrodenpuffer wurden 1,0 g Tris und 5,52 g Veronal in 1 l H_2O verwandt.

Abkürzungen: Tris = Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan als Puffersubstanz. Temed = N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin als Polymerisationskatalysator. Per = Ammoniumperoxodisulfat $(HN_4)_2S_2O_8$ als Polymerisationskatalysator. Bis = N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer.

2. *Elektrophoresezeit.* Diese betrug für jede untersuchte Hautprobe 45 und 75 min. Die unterschiedlichen Laufzeiten wurden angewandt, um eine Übersicht des Esterasemusters insgesamt zu erhalten und zugleich Unterschiede einzelner Esterasen der verletzten und unverletzten Haut exakter zu erfassen.

3. *Färbung.* Die Esterasen wurden mit α -Naphthylacetat als Substrat, mit Fast Red als Kupplungssalz dargestellt. Für 5 Gele wurden 20 mg α -Naphthylacetat in 1 ml Aceton gelöst, 35 mg Fast Red zugegeben, dann mit 0,04 mol Tris-HCl-Puffer pH7 vermischt. Das Reagenzglas mit dem Gel und der Färbelösung kam für 10—15 min in ein Wasserbad von 37°C. Entfärbung und Aufbewahrung in 10% Essigsäure. Zur Färbung der Proteine wurde Coomassie Blau R 250 benutzt. Als Inhibitor dienten $8 \cdot 10^{-5}$ Eserinsulfat und Natriumtaurocholat. Die Gele wurden 30 min in dieser Lösung gehalten, bevor die Esterasen dargestellt wurden.

4. *Haut: Entnahme und Aufarbeitung.* Die etwa 2:3 cm großen Bezirke verletzter und unverletzter Haut wurden jeweils derselben Leiche entnommen und bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei $-15^\circ C$ gehalten. Davon wurden 600 mg möglichst fein zerkleinert, mit 3 ml Puffer versetzt, 3 min in einem Hartglashomogenisator zu einem feinen Brei gerieben. Die Lösung 5 wurde 1:8 verdünnt, mit H_3PO_4 auf pH 5,0 eingestellt. Nach der Aufarbeitung der Probe hatte diese ein pH von etwa 5,5. Die Probe wurde für 24 Std bei $+4^\circ$ gehalten, anschließend zentrifugiert, vom klaren Überstand 100 μl abgemessen. Es wurden jeweils gleiche Mengen aus verletzter und unverletzter Haut während eines Elektrophoreselaufes untersucht. Zur vergleichenden Untersuchung des Plasma wurden 8 μl abgemessen und mit Puffer pH 5,5 auf 100 μl verdünnt. Die zur Elektrophorese eingesetzten Probemengen waren 100 μl aus 600 mg Haut (Cutis) mit 3 ml Puffer extrahiert.

5. *Wunden.* Es wurden 65 sicher vitale Wunden aus 32 Leichen untersucht. Bei 25 Leichen lag die Überlebenszeit zwischen 0—5 Std, bei 3 nach 6, 19 und 21 Std, bei 4 Leichen betrug sie 3, 5, 6 und 14 Tage. Nach der Wundform handelt es sich um Prellungen, Schürfwunden, Reiß-, Schnitt-, Platz- und Schußwunden.

Da immer vergleichend verletzte mit unverletzter Haut untersucht wurde, außerdem vielfache experimentell an Leichen gesetzte Wunden mituntersucht wurden, wurden über 1500 einzelne Elektrophoresen durchgeführt.

6. *Durchführung.* Jedes Trenngel wurde mit 150 μ l Sammelgel überschichtet. Die Polymerisation wurde nach 20 min erreicht. Damit Probe und Elektrodenpuffer sich nicht vermischen konnten, wurde Sephadex G 25 auf die Probe gebracht. Die Kammern wurden mit 1 Liter Elektrodenflüssigkeit, auf +4 bis -0°C abgekühlt, gefüllt. Die Elektrophorese wurde in einem Kühlschrank bei -10°C durchgeführt.

7. *Nomenklatur.* Nach Hoffmann-Ostenhof und Ehrenreich (1966) erhalten die Carboxylester-Hydrolasen die Bezeichnungen: 3.1.1.1. a) gruppenspezifische Carbonsäure-Esterasen mit verhältnismäßig geringer Substratspezifität; hierher gehören Lipasen und Esterasen im engeren Sinne, auch Aliesterasen genannt. Die Abgrenzung zu den Cholinesterasen ist schwer möglich, diese sind nur gegenüber dem Hemmstoff Eserin empfindlicher. 3.1.1.1.b). Die zweite Gruppe umfaßt die Carbonsäure-Esterasen mit strenger Substratspezifität, sog. Phospholipasen, Cholesterin-Esterasen, Chlorophyllase . . . 3.1.1.7 ist die Acetylcholin-acetylhydrolase (= Acetylcholinesterase). 3.1.1.8 ist die Acrylcholin-acylhydrolase (= Cholinesterase). Hardegg (1966) unterteilt die Cholinesterasen noch einmal nach ihrer Wirkungsschnelligkeit auf verschiedene Substrate: Cholinesterase I spaltet Acetylcholin schneller als Cholinester mit längeren Acylketten, Cholinesterase II spaltet Butyrylcholin schneller als Acetylcholin.

Ergebnisse

Nach einer Elektrophoresezeit von 45 und 75 min sind aus unverletzter Haut mit α -Naphthylacetat und Fast Red als Kupplungssalz 8 Esterase-positive Zonen darstellbar. Diese wurden — eine nähere Identifikation ist noch nicht möglich — mit 1—8 bezeichnet. Die Zonen 1, 2 und 5 sind Eserin-empfindlich, 3, 6, 8 unempfindlich, die Zone 7 wird durch Eserin nur wenig abgeschwächt. Eine sichere Beurteilung ist bei Zone 4 nicht möglich. Nach einer Laufzeit von 75 min werden die Zonen 2—6 deutlicher, die immer schwache Zone 4 überhaupt erst sichtbar, während Zone 8 das Gel bereits ganz durchlaufen hat (Abb. 1 a, b). Dieses für die unverletzte Haut gültige Muster ist von Fall zu Fall erstaunlich konstant. Bei Hautwunden wird dagegen ein Musterwechsel deutlich. Die Zonen 7 und 8 sind verstärkt, die Zonen 2—6 abgeschwächt, jedoch so, daß Zu- und Abnahme einen Zusammenhang mit dem Wundalter erkennen lassen. In allen untersuchten Proben der verletzten Haut sind 7 und 8 gegenüber denen der unverletzten Haut verstärkt. Je länger die Überlebenszeit ist, um so auffälliger ist dieser Unterschied. Die Zonen 2—6 sind in der verletzten Haut schwächer gegenüber denen der unverletzten Haut. Die einzelnen Zonen zeigen qualitative Unterschiede. So zeigt Zone 5 erst nach Tagen ein Minimum, während 2, 3 und 4 schon innerhalb Stunden stark abgeschwächt sind. Nach 3 Tagen sind im Vergleich zur unverletzten Haut diese jedoch wieder verstärkt und nehmen dann wieder an Intensität ab. Diese Differenzen sind bei längerer Überlebenszeit besonders deutlich.

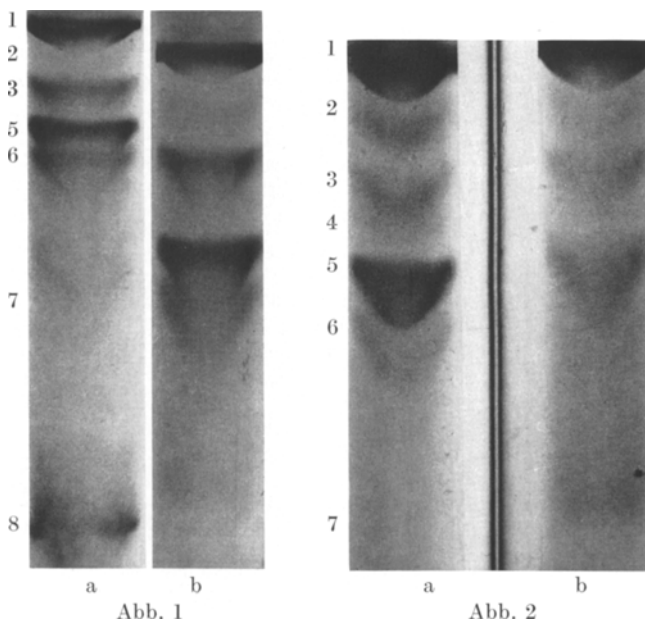


Abb. 1 a u. b. Haut. Esterasemuster der unverletzten Haut. Leichenalter 3 Tage. a Elektrophoresezeit 45 min. Fraktionen 1—8. Fraktionen 2, 4 u. 7 schwach (auf der Abb. nicht erkennbar). b Elektrophoresezeit 75 min. Fraktion 8 ist aus dem Gel gelaufen, Fraktion 3, 5 und 6 werden besonders deutlich

Abb. 2 a u. b. S 82/68 Heidelberg. Leichenalter 2 Tage. Überlebenszeit 5—10 min. Elektrophoresezeit 75 min. a Unverletzte Haut; b verletzte Haut: Fraktionen 5 und 6 abgeschwächt, Fraktion 7 wird deutlich

Zwischen unverletzter Haut und postmortal gesetzten Wunden bestehen keine Unterschiede im Esterasemuster.

Je länger eine Verletzung überlebt wird, um so deutlicher unterscheidet sich das Esterasemuster. Bei kurzer Überlebenszeit sind die Unterschiede unauffälliger, aber nachweisbar. Dabei handelt es sich nicht um quantitative Differenzen, da beim Einsatz verschiedener Probenmengen sich keine unterschiedliche Differenzen ergaben. Bei Auftrennung von 100 μ l Probe (Extraktion aus 16 mg unverletzter Haut) und Zusatz von 5 mg Plasma sind 7 und 8 gegenüber der Probe ohne Plasmaplatz Zusatz zwar stärker, jedoch nicht so stark wie in der verletzten Haut. Außerdem sind in verletzter Haut 7 und 8 vermehrt, 2 und 5 abgeschwächt. Die Differenzen zwischen verletzter und unverletzter Haut können durch den erhöhten Blutgehalt der verletzten Haut nicht erklärt werden, sondern ergeben sich aus der unterschiedlichen Aktivität der mit α -Naphthylacetat nachweisbaren Esterasen in verletzter und unverletzter Haut. Die Zunahme von 7 und 8, die Abnahme von 2—6 in

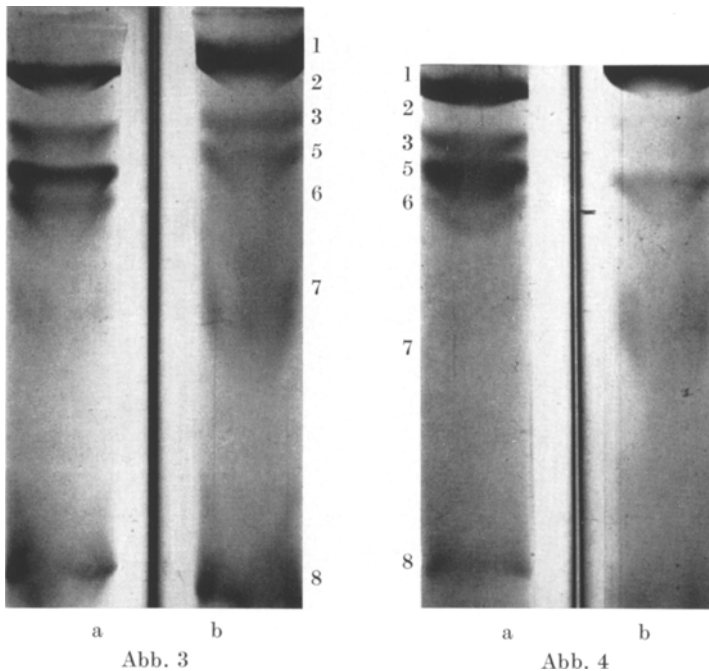


Abb. 3a u. b. S 179/69 Heidelberg. Leichenalter 3 Tage. Überlebenszeit 90 min., Elektrophoresezeit 45 min. a Unverletzte Haut; b verletzte Haut: 5 u. 6 abgeschwächt, 7 u. 8 verstärkt

Abb. 4a u. b. S 100/68 Heidelberg. Leichenalter 2 Tage. Überlebenszeit unbekannt, nicht länger als 6 Std. Elektrophoresezeit 45 min. a Unverletzte, b verletzte Haut: 3, 4, 5 u. 6 abgeschwächt, 7 u. 8 verstärkt

der verletzten Haut könnte bei Wunden noch durch den Verlust gewisser Esterase-haltiger Hautschichten zustande kommen. Die Untersuchung postmortal gesetzter Abschürfungen ergab jedoch hierfür keine Anhaltspunkte, obwohl ein umschriebener Schichtverlust der Haut eingetreten war. Die Schürfung ist deshalb als Beispiel herangezogen worden, weil in den oberen Schichten der Haut histochemisch (Braun-Falco, 1956) differente Esterasen nachgewiesen worden sind. Für qualitative Unterschiede des Musters spricht auch, daß Esterasen, die in Plasma und unverletzter Haut in gleicher Zeit gleiche Laufstrecken zurücklegen, in verletzter Haut teilweise zunehmen, teilweise abnehmen. Wenn der Blutgehalt entscheidend wäre, wäre zu erwarten, daß alle Zonen zunehmen.

Lindner (1962) stellte 4 Std nach experimenteller Hautverletzung (Ratte) eine Erhöhung der Esterase-Aktivität der Makrophagen fest. Pioch (1966) hat nach vitaler Hautverbrennung (Meerschweinchen) nach

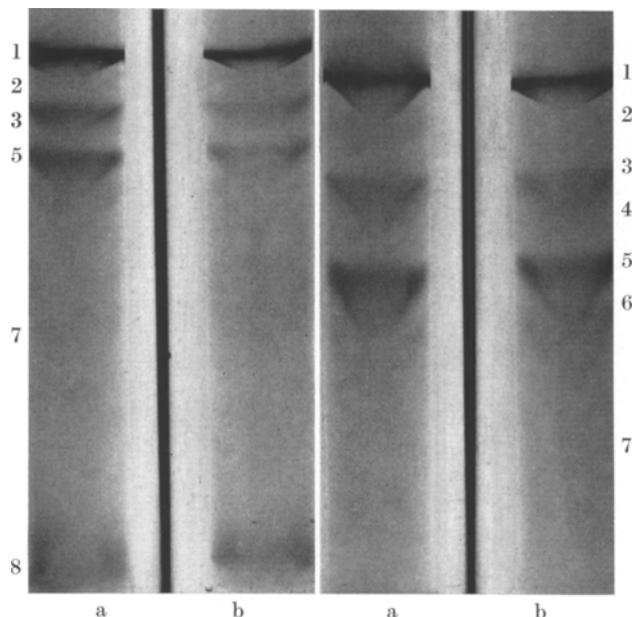


Abb. 5a u. b. S 188/68. Leichenalter 2 Tage. Elektrophoresezeit 45 und 75 min. a Unverletzte Haut; b postmortal verletzte Haut (Platzwunde): Kein Unterschied im Esterasemuster

5—15 min eine diffuse Esterase-Reaktion im subepidermalen Bindegewebe beobachtet und deren Zunahme über Stunden verfolgen können. Wie innerhalb einer so kurzen Zeit die erhöhte Esterase-Aktivität zustande kommt, ist noch ungeklärt, die Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen können durch die elektrophoretisch nachgewiesenen Differenzen im Esterasemuster der Haut als bestätigt angesehen werden. Die 15 min nach vitaler Verbrennung verstärkte extracelluläre Esterasereaktion um die Koagulationsnekrose wurde auf die Durchtränkung mit Blutplasma zurückgeführt. Das differente Esterasemuster vital verletzter Haut läßt sich jedoch nicht durch eine in der Haut erhöhte Blut- oder Plasmakonzentration erklären. Einschränkung könnte lediglich gesagt werden, daß verschiedenartige Hautwunden, jedoch keine Brandwunden, untersucht wurden. Hervorzuheben wäre jedoch, daß zwischen den einzelnen untersuchten Wunden hinsichtlich des Esterasemusters keine Unterschiede bestanden. Wenn mittels Discelektrophorese aus verletzter und unverletzter Haut mit α -Naphthylacetat 8 einzelne Esterasen dargestellt werden können, werden die histochemisch bekannten Zonenphänomene — auf die Raekallio (1965) besonders hingewiesen hat — verständlicher.

Es wäre zu prüfen, ob die Abnahme der Fraktionen 2—6 einerseits, die Zunahme der Fraktionen 7 und 8 andererseits auf einen Abbau der höhermolekularen Fraktionen zu der noch enzymatisch aktiven niedermolekularen Fraktionen 7 und 8 zurückzuführen ist. Dieser unmittelbar durch die Hautverletzung ausgelöste Abbau könnte das bereits 5 min später veränderte Esterasemuster erklärbar erscheinen lassen.

Zusammenfassung

Zur Unterscheidung vitaler und postmortaler Wunden wurden vergleichende Untersuchungen an unverletzter, vital und postmortal verletzter Haut des Menschen durchgeführt. Durch Discelektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel sind im kathodischen Gelbereich regelmäßig 8 einzelne Esterasefraktionen darstellbar. Von den mit 1—8 bezeichneten Fraktionen sind 1, 2 und 5 Eserin-empfindlich, 3, 6 und 8 unempfindlich, 7 teilweise empfindlich, bei Fraktion 4 ist keine sichere Beurteilung möglich. Die Fraktionen 7 und 8 sind in vitalen Hautwunden immer stärker als in unverletzter Haut. Die Fraktionen 2—6 sind in vitalen Hautwunden abgeschwächt. Zwischen unverletzter Haut und postmortalen Wunden bestehen keine Unterschiede im Esterasemuster. Die discelektrophoretische Bestimmung des Esterasemusters der Haut ermöglicht eine Unterscheidung zwischen vitalen und postmortalen Wunden bereits kurz nach ihrer Entstehung.

Summary

Comparative examinations of undamaged, premortal damaged, and postmortal damaged skin were carried out. A distinct differentiation between pre- and postmortal wounds was achieved using disc electrophoresis with discontinuous polyacrylamid gel.

In the cathode area of the gel 8 single esterase fractions could be determined. These bands were arbitrarily numbered 1 through 8, number 1 being closest to the cathode. Bands 1, 2 and 5 were eserin sensitive; bands 3, 6 and 8 were non-sensitive, band 7 was somewhat sensitive and band 4 showed no clear distinction. The fractions 7 and 8 regularly showed up more intensely in premortal skin wounds than in undamaged skin. The bands 2 through 6 were weaker in premortal wounds. No difference in esterase pattern was observed in undamaged skin and postmortal wounds.

Literatur

- Baron, K. D., Bernsohn, J. I., Hess, A.: Separation and properties of human brain esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 139—156 (1963).
Braun-Falco, O.: Beitrag zum histochemischen Nachweis von Esterasen in normaler und psoriatischer Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* **202**, 153—162 (1956).

- Gerin, C.: Les methodes histologiques en medicine légale. Actes XXX Congr. internat. Coimbra 1965.
- Gössner, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958).
- Gomori, G.: The histochemistry of esterases. *Int. Rev. Cytol.* **1**, 323 (1952).
- Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479 (1955).
- Hardegg, W.: Cholinesterasen. In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathophysiologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl. Bd. 6, Teil B (Enzyme), Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- Hoffmann-Ostenhof, O., Ehrenreich, R.: Hydrolasen. In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl. Bd. 6, Teil B, S. 877. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- Hunter, R. L., Markert, C. L.: Histochemical demonstration of, enzymes separates bei zone electrophoresis in Strach Gel. *Science* **125**, 1294, 1295 (1957).
- Klein, H., Gärtner, K., Günther, R.: Die Variante C₅ der Cholinesterasen des Serums. Experimentelle Untersuchungen über Mikromethoden der Gelelektrophorese. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **61**, 137—147 (1967).
- Lindner, J.: Die Morphologie der Wundheilung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **301**, 39—66 (1962).
- Marghescu, S., Braun-Falco, O.: Über Esterasen-Isoenzyme in der Hornschicht bei Hautgesunden sowie bei Psoriasis, Ekzem und Ichthyosis. Enzymelektrophoretische Untersuchungen an Schuppenextrakten. *Arch. klin. exp. Derm.* **224**, 42—47 (1966).
- Markert, C. L., Hunter, R. L.: The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 42—49 (1959).
- Matoltsy, A. G., Matoltsy, M. N.: A study of the soluble proteins of normal and pathologic horny tissues by a modified disc electrophoresis technic. *J. invest. Derm.* **41**, 255 (1963).
- Maurer, H. R., Disk-Elektrophorese. Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1968.
- Montagna, W.: Histology and cytochemistry of human skin. IX. The distribution of non-specific esterases. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, Nr 1, 13—16 (1955).
- Formisano, V. R.: Esterase activity in the skin of mammals. *J. Anat. (Lond.)* **89**, Part 4, 425—430 (1955).
- Mueller, B.: Zur Frage der Unterscheidung von vitalen bzw. agonalen und postmortalen Blutungen. *Acta med. leg. soc.* **17**, 43 (1964).
- Ornstein, L., Davis, B. J.: Disc electrophoresis, Parts I and II. Distillation products industries, Rochester, N.Y. (1962).
- Pioch, W.: Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis. Lübeck 1966.
- Rackallo, J.: Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing. *Nature (Lond.)* **188**, 234—235 (1961).
- Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzym-histochemischen Methoden. In: Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Bd. 3. Lübeck: Max Schmidt-Römhild, 1965.
- Lindfors, R., Eleving, G., Hästbacka, J., Puittinen, J.: Histochemical observations on wound healing in denervated and healthy rat skin. *Acta path. microbiol. scand.* **62**, 53 (1964).
- Scheiffarth, F., Götz, H., Ebert, S.: Über Esterase-aktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten. *Clin. Chim. Acta* **14**, 519—522 (1966).

- Steigleder, G. K.: Die Fähigkeit der Hautoberfläche zur Esterspaltung und Esterbildung. III. Mitt. Das Verhalten der esterspaltenden Enzyme (unspezifische Esterasen und Phosphatasen) auf der Hautoberfläche und unter der Hornschicht unter normalen und pathologischen Bedingungen, mit besonderen Hinweisen auf die Acne vulgaris und die Psoriasis. Arch. klin. exp. Derm. **209**, 313—326 (1959).
- Löffler, H.: Zum histochemischen Nachweis unspezifischer Esterasen und Lipasen. Arch. klin. exp. Derm. **203**, 41—60 (1956).

Prof. Dr. H. Klein
Univ.-Institut f. gerichtliche Medizin,
Abtl. Verkehrsmedizin
6900 Heidelberg, Voßstr. 2