

## **Aktivitätsveränderungen der unspezifischen Esterasen im Wundheilungsprozeß. Untersuchungen mit Hilfe der Elektrofokussierung**

Wolfgang Bonte und Volker Herrmann

Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen, Windausweg 2, D-3400 Göttingen,  
Bundesrepublik Deutschland

### **Activity Alterations of Unspecific Esterases During Wound Healing. Investigations by Means of Electrofocusing**

**Summary.** Electrofocusing of skin-wound extracts on polyacrylamide flat gels is appropriate for zymographic separation of the esterase isoenzymes. In animal experiments and corpse material most fractions indicated non-synchronous, wound-age depending alterations of activity. As early as 15 minutes after incision obvious activity increases of A<sub>1-3</sub>-isoenzymes could be demonstrated, followed by a transitory decrease and another maximum. Important activities of the A<sub>4</sub>-isoenzymes became evident not before the 1<sup>st</sup> (human) resp. 3<sup>rd</sup> hour (guinea pig) after incision. There are no sufficient correlations between activity alterations and wound age, to allow a fairly exact time interval classification.

**Key words:** Esterases, wound-age – Wound healing – Chemistry of enzymes.

**Zusammenfassung.** Die Elektrofokussierung von Wundrandextrakten auf Polyacrylamid-Flachgelen ist zur Darstellung der Esterase-Isoenzymgruppen gut geeignet. Im Tierexperiment und in Leichenmaterial zeigten sich asynchrone, vom Wundalter abhängige Aktivitätsveränderungen. Intensivierungen der Esterase A<sub>1-3</sub>-Fraktionen waren bereits innerhalb der ersten 15 Minuten nach dem Trauma zu erkennen, nahmen dann aber wieder ab, um später zu einem zweiten, intensiveren Aktivitätsmaximum überzugehen. Die A<sub>4</sub>-Isoenzyme wiesen deutliche Aktivitätssteigerungen erst nach der 1. (Mensch) bzw. 3. Stunde (Meerschweinchen) auf. Die Alterationen besitzen keine befriedigende Korrelation zum Wundalter, die für Zeitschätzungen verwertbar erscheint.

**Schlüsselwörter:** Esterasen, Wundalter – Wundaltersbestimmung, unspezifische Esterasen – Wundheilung, Enzymchemie.

Die Bedeutung der unspezifischen Esterasen für die Wundaltersbestimmung kurzzeitig überlebter Hautläsionen ist unbestritten (Raekallio, 1965, 1970; Pioch, 1966; Berg,

1972, 1975). Die üblichen histochemischen Nachweistechiken haben eine Reihe von Problemen aufgeworfen, welche bisher nicht befriedigend gelöst werden konnten. Der Hauptmangel ist die praktisch nicht erreichbare quantitative Erfassung der Enzymaktivität (Pioch, 1966). Unklarheiten bestehen aber auch hinsichtlich der Charakterisierung der nachgewiesenen Fermente. Zweifellos handelt es sich ja um ein Fermentgemisch, dessen einzelne Komponenten möglicherweise topisch different verteilt sind. So wurde darauf hingewiesen, daß durch die 4 häufigsten Nachweisverfahren mit  $\alpha$ -Naphthylacetat, Naphthol-AS-Acetate, Naphthol-ASD-Chloracetat und mit Bromindoxylacetat nicht dieselben Esterasen erfaßt werden (Gomori, 1952; Pearse, 1960; Pioch, 1966).

Neue Ansatzpunkte haben sich mit der Verbesserung der Zymographie-Techniken ergeben. Seit der Entdeckung des Esterase-D-Polymorphismus durch Hopkinson et al. (1973) ist der qualitativen Ansprache der einzelnen Esterasefraktionen in der human-genetischen Forschung mit Hilfe modernerer Elektrophorese-Verfahren, neuerdings auch der Elektrofokussierung (Grüner und Simeoni, 1978) viel Aufmerksamkeit gewidmet worden (Übersicht bei Harris und Hopkinson, 1976; vgl. auch Cortivo et al., 1978, Suzuki et al., 1978). Im Rahmen traumatologischer Untersuchungen hatten Jarecki et al. schon 1969 darauf verwiesen, daß sich in der Disc-Elektrophorese mehrere Esterase-Frak-tionen darstellen, die während des Wundheilungsprozesses qualitativen Veränderungen unterworfen sind. In einer weiteren Arbeit (1970) wurden diese Differenzen mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung bestätigt. Eine Klassifizierung der Enzymbanden wurde noch nicht vorgenommen.

Wir selbst haben kürzlich darauf hingewiesen, daß sich in der von uns neu eingeführten Technik der Histo-elektrofokussierung in experimentellen Meerschweinchenwunden mehrere Fermentfraktionen nachweisen lassen, welche eine eindeutige topische Beziehung zum eigentlichen Wundrandgebiet besitzen (Bonte, 1978 a, b) und andere, welche auch noch in der weiteren Wundumgebung anzutreffen sind. Die verschiedenen Enzymgruppen verhalten sich während der Heilung keineswegs synchron. Wir stellten uns daher die Aufgabe, die Elektrofokussierung der Unspezifischen Esterasen in Paralleluntersuchungen mit Wundextrakten und Kryostatschnitten an experimentellem Leichenmaterial auf Tauglichkeit für die praktische Wundaltersbestimmung zu überprüfen.

## Material und Methodik

### 1. Tierversuche

Die Tierversuche wurden mit 200–250 g schweren männlichen Albino-Meerschweinchen vom Stamm Pirbright White W 58 durchgeführt. Den Tieren wurden in Halothane-Narkose nach Rasur jeweils zwei etwa 1 cm lange Skalpell-schnitte im Bereich der Rücken-haut rechts und links der Mittellinie beigebracht. Die Tiere wurden nach unterschiedlichen Überlebenszeiten mit Halothane-Überdosis getötet. Folgende Überlebenszeiten wurden gewählt: 2 Minuten, dann 15 minütige Schritte bis zur 2. Überlebensstunde, 30 minütige Schritte bis zur 6. Überlebensstunde, schließlich stündliche bis zur 12. Überlebensstunde und 24 Stunden. Zum Vergleich wurden postmortale Wunden gesetzt; außerdem wurden Hautstücke unverletzter Meerschweinchen untersucht. Die Wunden wurden so ausgeschnitten, daß etwa 1 x 1 cm große Hautlappen resultierten, welche vom Unterhautfettgewebe befreit wurden. Zu Vergleichszwecken wurden einem unverletzten Tier ferner Proben der Organe und Körperflüssigkeiten entnommen. Sämtliche Proben wurden sofort bei  $-27^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, später in halbgefrorenem Zustand mit einem Skalpell kleingeschnitten, dann

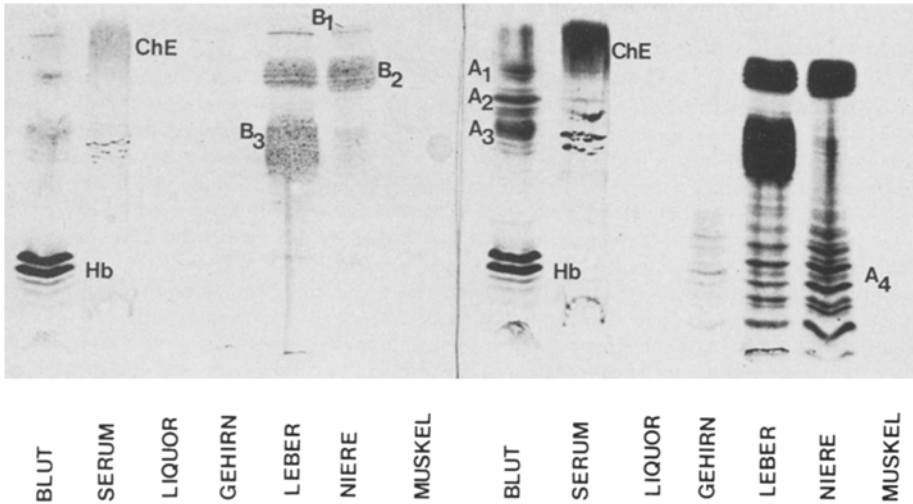


Abb. 1. Klassifizierung der Esterasen in menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten. Elektrofokussierung und Nachweis mit  $\alpha$ -Naphthylbutyrat (links) und  $\alpha$ -Naphthylacetat (rechts)

1 : 2 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt im Ultra-Turrax homogenisiert, über Nacht eluiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die Elektrofokussierung verwendet.

## 2. Leichenmaterial

Die Organ- und Körperflüssigkeitsproben wurden einer bei einem Unfall ums Leben gekommenen jungen Frau 6 Stunden nach dem Tod entnommen. Die menschlichen Wundproben stammten aus dem laufenden Obduktionsgut. Es wurden nur Hautwunden untersucht, deren Alter zuverlässig bekannt war. Es handelte sich um Wunden, die durch stumpfe oder scharfe fremde Gewalteinwirkung entstanden waren. In allen Fällen war die Todesursache mit der Gewalteinwirkung kausal verknüpft. Die Hautproben wurden aus dem unmittelbaren Wundgebiet durch Ausschneiden eines etwa 1 cm langen und 5 mm breiten Streifens – quer zur Wundachse – gewonnen, in halbgefrorenem Zustand manuell vorzerkleinert und dann unter Eiskühlung nach Zusatz von 0,9 % NaCl (1 : 2) im Ultra-Turrax homogenisiert. Zur Weiterbehandlung vgl. oben.

## 3. Elektrofokussierung

Das Verfahren wurde ausführlich von Arbuthnott und Beeley (1975), sowie Righetti (1975) beschrieben. Den hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine Arbeitsanleitung von Neumann (1976) zugrundegelegt. Die Auftrennung erfolgte auf Ampholine-Polyacrylamid-Flachgelen pH 3,5–9,5 (LKB Bromma, Schweden) bei 40 Watt konstanter Leistung und 10°C Kühlung. Die verwendete Multiphor-Kammer (LKB) erlaubt den Direktaufsatz der Kontaktelektroden auf puffergetränkte Filterpapierstreifen, welche auf den Längsseiten des Gels aufgetragen werden. Als Puffer dienten molare Lösungen von  $H_3PO_4$  (anodisch) und NaOH (kathodisch). Aufgetragen wurden von jeder Probe 20  $\mu$ l mittels gleichgroßer Filterpapierstücke, welche nach einstündigem Lauf entfernt wurden. Von den meisten Wunden wurden in Parallelversuchen zusätzlich 25  $\mu$ m dicke Kryostatschnitte mit Hilfe von Deckgläsern aufgetragen (vgl. Bonte 1978 a, b). Die Gläserchen wurden nach 1 Stunde wieder abgenommen, die Histoschnitte belassen. Danach wurde bis zur endgültigen Auftrennung eine weitere Stunde elektrofokussiert. Während des insgesamt zweistündigen Laufs stieg die Spannung von etwa 250 V auf 1100 V, während die Stromstärke von 50 mA auf 21 mA zurückging.

#### 4. Esterase-Nachweis

Die elektrofokussierten Esterasen lassen sich mit geringen Modifikationen mit Hilfe der aus der Histochemie bekannten Verfahren nachweisen. Von den 4 am häufigsten gebrauchten Substraten haben wir mit Naphthol-ASD-Acetat nach Moloney et al. in der Arbeitsanleitung von Löffler (1971), mit Naphthol-AS-Acetat nach Gomori (1952) und mit 5-Bromindoxylacetat nach Holt (1954) nach mehrstündiger Inkubation lediglich schwache und schon etwas diffuse Präzipitate darstellen können, die einer quantitativen Auswertung nicht zugänglich waren. Die besten Ergebnisse wurden mit  $\alpha$ -Naphthylacetat nach Gomori (1950) in der Modifikation von Pearse (1953) erhalten. Zur Identifizierung der einzelnen Esterasebanden wurden zusätzliche Versuche mit  $\alpha$ -Naphthylbutyrat (Darstellung der Esterase-B-Typen; gleicher Reaktionsansatz) und Acetylthiocholinjodid durchgeführt (Darstellung der Cholinesterase nach Karnovsky und Roots, 1964).

Arbeitsanleitung: 10 minütige Vorpufferung in 250 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4; 60 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur in einer Lösung aus 75 mg  $\alpha$ -Naphthylacetat (gelöst in 2,5 ml Aceton), 250 ml 0,1 M Phosphatpuffer 7,4 und 250 mg Fast Blue B. Die Lösung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und filtriert; der pH-Wert sollte zwischen 7,2 und 7,4 liegen. Anschließend erfolgt 10 minütige Wässerung in aqua dest. Die Befunde können durchlichtdensitometrisch ausgewertet werden.

### Ergebnisse

#### 1. Identifizierung der Esterasebanden

Die qualitative Klassifizierung der fokussierten menschlichen Esterase-Isoenzyme ist in Abb. 1 wiedergegeben. Zum Vergleich wurden die Angaben von Harris und Hopkinson (1973) herangezogen. Am leichtesten sind die Esterase-B-Fraktionen festzulegen: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> lassen sich sowohl mit  $\alpha$ -Naphthylacetat, als auch -butyrat darstellen; B<sub>1</sub> ist eine einzelne Bande, die außer im Blut in fast allen Organen vorkommt, B<sub>2</sub> verfügt in der Niere über mehr Fraktionen, als B<sub>3</sub>, in der Leber umgekehrt. Die A-Typen sind mit  $\alpha$ -Naphthylacetat, aber nicht mit -butyrat zu erfassen; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> kommen nur in Erythrozyten vor, A<sub>4</sub> in allen Geweben, aber nur schwach in Ery; A<sub>5</sub> und A<sub>6</sub> sind von den hier gewählten Substraten nur im Gehirn nachzuweisen, A<sub>7</sub> auch hier nicht. B<sub>4</sub> und D können weder mit  $\alpha$ -Naphthylacetat, noch -butyrat dargestellt werden; das gilt auch für die Carbonanhydrase. Die Cholinesterase-Isoenzyme stellen sich mit beiden Substraten nur als relativ diffuser Bandenkomplex ganz im Sauren dar, was durch spezifische Substrate erhärtet werden konnte.

Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Enzym-Muster der Haut zeigt Abb. 2 a. Da entsprechende Erfahrungen mit Meerschweinchen-Material bisher fehlen, konnte eine sichere qualitative Ansprache nicht vorgenommen werden. Analog dem o. g. Vorgehen wurden auch vergleichende Untersuchungen mit Meerschweinchen-Organen durchgeführt. Danach ist zu vermuten, daß die Zuordnung der Banden entsprechend Abb. 2 b vorzunehmen ist.

#### 2. Veränderungen während der Wundheilung

Die Ergebnisse der Tierversuche gibt Abb. 3 wieder. In der frühen Wundheilungsphase kommt es zu einer asynchronen Intensivierung und Vermehrung der Banden, die vornehmlich im stark sauren (vermutlich ChE, Es A<sub>1</sub> und Es A<sub>2</sub>) und schwach alkalischen Bereich liegen (vermutlich Es A<sub>4</sub>). Wie wir früher zeigen konnten (Bonte, 1978 b), handelt es sich bei den Isoenzymen im sauren Bereich um Esterasen, welche ausschließlich im engeren Wundrandgebiet auftreten. Zwischen der 90. und 150. Minute nach Wundsetzung kommt es zu einem deutlichen Aktivitätsrückgang. Danach werden alle

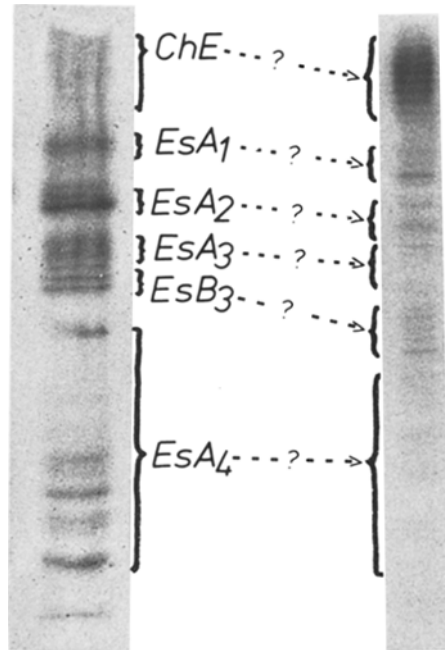


Abb. 2 a, b. Isoenzymfraktionen im Wundrandextrakt einer 4 Std. überlebten Humanwunde (links, a) und einer 9 Std. überlebten tierexperimentellen Hautwunde (rechts, b). Die Zuordnung der tierischen Fraktionen wurde durch Analog-Versuche zu Abb. 1 vorgenommen

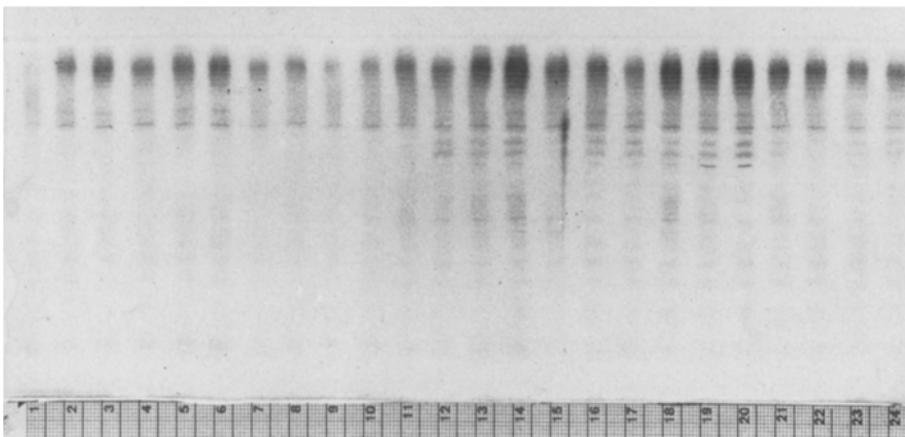
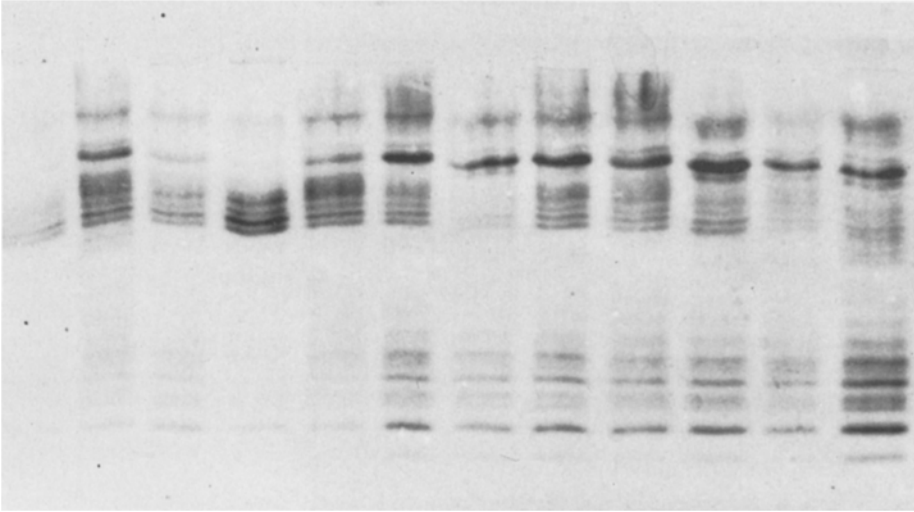


Abb. 3. Esterasen in Meerschweinchenhaut nach experimenteller Schnittverletzung. Wundalter von links nach rechts: 2, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 Minuten, 2 1/2, 3, 3 1/2, 4, 4 1/2, 5, 5 1/2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 Stunden

Banden, besonders die Gruppe im Sauren zunehmend deutlicher, und um die 8. bis 9. Stunde nach dem Trauma bildet sich ein zweites Maximum; in dieser – zweiten – Anstiegsphase treten zusätzliche Banden im schwach Sauren und im Neutralen auf (wahrscheinlich Es A<sub>3</sub> und Es B<sub>3</sub>).



**Abb. 4.** Esterasen in menschlichen Hautwunden. Von links nach rechts: unverletzte Haut, Hautwunden mit Überlebenszeiten von ca. 5, 10, 20, 45, 60, 90 Minuten, 2, 4, 24 Stunden, 3 und 14 Tagen

Bei der Fokussierung menschlicher Wundrandextrakte ergab sich das in Abb. 4 wiedergegebene Bild. Auch beim Menschen gibt es deutliche Differenzen im Verhalten der einzelnen Isoenzym-Gruppen. Von Bedeutung sind überhaupt nur Es A<sub>1-4</sub>, Es B<sub>3</sub> und ChE. Die letztere ist dabei so unregelmäßig, daß sie für Zeitstellungen praktisch nicht zu gebrauchen ist; ähnliches gilt auch für Es A<sub>3</sub>. Es A<sub>1</sub> und Es A<sub>2</sub> verhalten sich einigermaßen ähnlich und weisen bereits in der wenige Minuten überlebten Wunde eine deutliche Aktivitätszunahme auf, um dann aber wieder ebenso deutlich zurückzugehen. Von der 1. Stunde nach Wundentstehung an kommt es zu einem erneuten, jetzt ziemlich intensiven Aktivitätsanstieg, der mehrere Tage anhält. Es B<sub>3</sub> verhält sich insofern abweichend, als das Aktivitätsminimum der vorbeschriebenen Isoenzyme auf etwa die 90. Minute verschoben ist. Ein ganz anderes Bild zeigen die Es A<sub>4</sub>-Isoenzyme, die in gewichtiger Konzentration erst von der 1. Stunde ab in Erscheinung treten und dann — mit gewissen Unregelmäßigkeiten — einen ständigen Aktivitätszuwachs erfahren. Die parallel durchgeführte Histofokussierung brachte gegenüber der Elektrofokussierung von Wundrandextrakten keinen entscheidenden Vorteil. Sie empfiehlt sich lediglich, wenn eine histochemische Bearbeitung von Wundmaterial geplant ist, die ohnehin die Anfertigung von Kryostatschnitten tiefgefrorener unfixierter Hautproben erfordert, oder wenn zu wenig Material zur Verfügung steht.

### Diskussion

Bei den Untersuchungen wurde auf den Einsatz der in der Serologie bevorzugten 4-Methylumbelliferylester verzichtet. Die hiermit am günstigsten darstellbaren Esterase-D-Isoenzyme sind wegen ihres genetisch determinierten Polymorphismus für Wundaltersbestimmungen an heterogenem Material nicht sonderlich geeignet. Von den übrigen Esterasen wurden außer bei der Cholinesterase bisher nur bei den Esterasen

A<sub>1-3</sub> Varianten beschrieben, die aber so selten sind, daß eine Störung bei unseren Untersuchungen unwahrscheinlich war. Wir haben auch auf Paralleluntersuchungen in der konventionellen Stärkegel-Elektrophorese verzichten können, die ja vor allem bei der Klassifizierung der einzelnen Banden gute Dienste geleistet hätte. In der Arbeit von Harris und Hopkinson (1973) sind solche Befunde aber ausreichend dokumentiert, so daß hier darauf zurückgegriffen werden konnte. Sowohl was die Tierexperimente angeht, als auch bei der Bearbeitung menschlichen Wundmaterials stellt sich in der Elektrofokussierung ein sauberes Bandenmuster dar, welches nach unserem Dafürhalten nicht durch unregelmäßig auftretende Nebenbanden gestört wird, was von Gründer und Simeoni (1978) bei den Fluoreszenzverfahren bemängelt wurde.

Zwischen den Untersuchungsergebnissen an tierischem und menschlichem Material ist eine gewisse Ähnlichkeit nicht zu verkennen. In beiden Untersuchungsreihen stellt sich in der frühen Wundheilungsphase ein schwaches Aktivitätsmaximum dar, welches vor allem die Fraktionen A<sub>1-3</sub> betrifft; diese Frühreaktion hält aber offenbar nicht sehr lange an, denn bereits zwischen der 20. und 60. Minute (Mensch), bzw. 1 1/2 bis 2 1/2 Stunden nach dem Trauma (Meerschweinchen) verblasen die Enzymbanden wieder. Da die Fraktionen A<sub>1-3</sub> vor allem in Erythrozyten, also im Blut enthalten sind, stellt sich die Frage, ob sich hier nicht ganz einfach das hämorrhagische Extravasat bemerkbar macht. Das ist nicht unwahrscheinlich, denn die am ungefärbten Gel noch gut zu erkennenden Hb-Banden zeichnen sich durch ähnliche Intensitätsveränderungen aus. Andererseits könnte eine Beziehung zu den Beobachtungen von Fatteh (1966) und Pioch (1966) bestehen, die bereits 10 bzw. 15 Minuten nach Traumatisierung eine deutliche Zunahme der Esteraseaktivität sahen. Arima und Nagamori (1965) beschrieben eine Aktivitätszunahme nach 30 Minuten, Tanaka (1966) nach 1 Stunde. Nicht leicht zu erklären ist der Aktivitätsrückgang in der nachfolgenden Phase. Ein Verdünnungseffekt durch das sich entwickelnde Ödem ist wenig wahrscheinlich, da die Ödemflüssigkeit, ähnlich wie das Serum cholinesterasehaltig sein dürfte. Eine entsprechende Zunahme der ChE-Fraktion ist aber nicht zu sehen. Die Fraktionen A<sub>1-3</sub> und B<sub>3</sub> weisen dann im weiteren Verlauf eine erneute, jetzt sehr deutliche Aktivitätszunahme auf, die aber wiederum synchron zu einer Intensitätszunahme der Hämoglobine verläuft. Vielleicht zeichnet sich hier lediglich eine Phase der Hyperämie im Wundgebiet ab.

Da die A<sub>4</sub>-Isoenzyme weder im Blut, noch im Serum enthalten sind, kann für sie eine entsprechende Erklärung nicht in Anspruch genommen werden. Wenn man von einer ganz schwachen Aktivität in der Frühphase absieht, kennzeichnet diese Enzymfraktion die spätere Wundheilungsphase. Deutliche Aktivitätszunahmen waren im menschlichen Material frühestens 1 Stunde, im Tiermaterial frühestens 2 1/2 Stunden nach dem Trauma festzustellen. Die Fermentaktivität scheint mit gewissen Schwankungen danach ständig zuzunehmen. Man könnte durchaus daran denken, daß eine Entsprechung zu den histomorphologischen und histochemischen Veränderungen um diese Zeit besteht. Raekallio (1965) sah 4 Stunden nach dem Trauma einzelne eingewanderte esterasebeladene polymorphkernige Leukozyten, die sich dann an Zahl vermehrten; Lindner (1962) beschrieb Esteraseaktivität in den von diesem Zeitpunkt an mit Pino- und Phagozytose befaßten histiocytären Elementen; nach 8 Stunden fanden sich auch bereits aktivierte Fibroblasten. Damit war auch schon vom morphologischen Bild her mit Esterasen zu rechnen, die von denen der Frühzeit – diffuse braun-violette Niederschläge zwischen den Bindegewebsfasern (Pioch, 1966) – differieren.

Vor allem die Esterase A<sub>4</sub>-Isoenzyme könnten demnach für die Wundaltersbestimmung von Bedeutung sein. Was schon im Tierversuch angedeutet zu sehen war, nämlich die nicht ganz lineare Aktivitätszunahme und das Vorhandensein einzelner Ausreißer, stört aber leider die Zymographie der menschlichen Isoenzym-Fractionen noch viel mehr. Wohl spricht ein stark positiver Befund der Esterase A<sub>4</sub>-Isoenzyme in der menschlichen Hautwunde sicher für eine Überlebenszeit von mehr als 1 Stunde; eine Abgrenzung gegenüber Befunden, welche wesentlich länger, nämlich bis etwa zu einem Tag überlebt wurden, kann aber nicht vorgenommen werden. Erst in der Spätphase nach mehreren Tagen gibt es quantitativ hinreichend erfassbare weitere Intensitätsanstiege. Eine lediglich schwach positive Fermentreaktion im Bereich der A<sub>4</sub>-Banden spricht angesichts der Ausreißer nicht sicher gegen ein Wundalter von über einer Stunde. Wir müssen uns daher Berg und Ebel (1969) anschließen, die bereits bei histochemischer Untersuchungstechnik – trotz brauchbarer Ergebnisse im Tierversuch – in menschlichem Material keine zweifelsfrei für die forensische Praxis geeignete zeitliche Beziehung der Esteraseaktivität zum Wundalter nachweisen konnten.

## Literatur

- Arbuthnott, J. P., Beeley, J. A.: Isoelectric focusing. London: Butterworths 1975
- Arima, T., Nagamori, H.: A histochemical study on skin wound. *Kagaku Keisatsu Kenkyoshu Hokoku* 18, 193–197 (1965)
- Berg, S.: Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. *Z. Rechtsmed.* 70, 121–135 (1972)
- Berg, S.: Vitale Reaktionen und Zeitschätzungen. In: Mueller, B. (Hrsg.), *Gerichtliche Medizin*, 2. Aufl., Band 2. Berlin–Heidelberg–New York: Springer 1975
- Berg, S., Ebel, R.: Altersbestimmung subkutaner Blutungen. *Münch. Med. Wschr.* 1185–1190 (1969)
- Bonte, W.: Die Histoelktrofokussierung. Eine Möglichkeit zur Lösung quantitativer ferment-histochemischer Probleme. *Naturwissenschaften* 65, 67 (1978 a)
- Bonte, W.: Eine neue Methode der histochemischen Wundaltersbestimmung: die Histoelktrofokussierung. *Acta histochem.* 62, 68–77 (1978 b)
- Cortivo, P., Breda, F., Ongaro, G., Bareggi, G., Ferraretto, L.: Red cell esterase-D-polymorphism in the Veneto population. *Z. Rechtsmed.* 81, 103–105 (1978)
- Fattah, A.: Histochemical distinction between antemortem and postmortem skin wounds. *J. Forens. Sci.* 11, 17–27 (1966)
- Gomori, G.: Pitfalls in histochemistry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 50, 968–981 (1950)
- Gomori, G.: The histochemistry of esterases. *Intern. Rev. Cytol.* 1, 323–335 (1952)
- Grüner, O., Simeoni, E.: Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Esterase D. *Z. Rechtsmed.* 81, 261–267 (1978)
- Harris, H., Hopkinson, D. A.: *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam–Oxford: North-Holland Publishing Comp. 1976
- Holt, S. J.: A new approach to the cytochemical localisation of enzymes. *Proc. Roy. Soc.* 142-B, 160–169 (1954)
- Hopkinson, D. A., Mestriner, M. A., Cortner, J., Harris, H.: Esterase D: A new human polymorphism. *Ann. Hum. Genet.* 37, 119–137 (1973)
- Jarecki, R., Arndt, U., Schultz, C., Klein, H.: Zur Unterscheidung vitaler und postmortaler Wunden durch Bestimmung des Esterasemusters der Haut. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 66, 161–169 (1969)
- Jarecki, R., Pogacar, P., Günther, G., Klein, H.: Early enzyme changes in skin wounds demonstrated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Z. Rechtsmed.* 67, 313–318 (1970)



- Karnovsky, M. J., Roots, L.: A „direct-coloring“ thiocholine method for choline esterase. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219–221 (1964)
- Lindner, J.: Die Morphologie der Wundheilung. *Langenbeck's Arch. Klin. Chir.* **301**, 39–70 (1962)
- Löffler, H.: Unspezifische Esterasen. *Acta histochem., Suppl.* **9**, 67–74 (1971)
- Moloney, W. C., McPherson, K., Fliegelman, L.: Esterase activity in leucocytes demonstrated by the naphthol-ASD-chloracetate substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 200–203 (1960)
- Neumann, G.: Analytische Elektrofokussierung. *G-I-T-Fachz. Lab.* **11**, 1212–1217 (1976)
- Pearse, A. G. E.: The intracellular localisation of esterases. *J. Path. Bact.* **66**, 331–333 (1953)
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*. London: Churchill 1960
- Pioch, W.: Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966
- Raekallio, J.: Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Lübeck: Schmidt-Römhild 1965
- Raekallio, J.: *Enzyme histochemistry of wound healing*. Stuttgart–Portland: Fischer 1970
- Righetti, P. G.: *Progress in isoelectric focusing and isotachopheresis*. Amsterdam: North-Holland 1975
- Suzuki, T., Kashimura, S., Umetsu, K., Kudo, T.: Esterase D phenotypes in northeastern Japan. *Z. Rechtsmed.* **81**, 119–123 (1978)
- Tanaka, M.: The distinction between antemortem and postmortem skin wounds by esterase activity. *Jap. J. Leg. Med.* **20**, 231–239 (1966)

Eingegangen am 21. Juni 1978