

Enzymaktivität isolierter Leukozytenpopulationen

II. Zytochemische und zymographische Untersuchungen an Leichenblut

M. Oehmichen¹ und J. Kömpf²

¹Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln, Melatengürtel 60-62, D-5000 Köln 30, Bundesrepublik Deutschland

²Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, Wilhelmstr. 27, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Enzymatic Activity of Isolated Leukocyte-Populations

II. Cytochemical and Zymographic Studies of Cadaver Blood

Summary. Blood was taken from the femoral vein of 17 autopsied cadavers with different diagnoses and postmortal intervals (10-120 h).

The granulocytes and lymphocytes were isolated with routine methods. The cell suspensions were subject to morphologic, enzyme-cytochemical (naphthol AS-D chloroacetate esterase) and electrophoretic (PGM₁, PGM₃, GOT_M, PEPA, ME_M, FUCA) investigations. The following results were obtained:

1. Erythrocyte-free cell suspensions are only found during short postmortal intervals;
2. Isolation of pure lymphocytes from cadaver blood using the described method is only possible very early in the postmortal interval (within 10 h);
3. The isolated granulocytes contain an impressively high percentage of eosinophilic granulocytes;
4. The percentage of naphthol AS-D-chloroacetate esterase-positive granulocytes is considerably lower in stored, conserved blood than in blood smears;
5. Identification of the above mentioned enzymes from isolated granulocytes from all cadavers is possible by electrophoresis.

Key words: Enzyme activity, leukocytes - Cadaver blood, identification of enzymes

Zusammenfassung. Aus Schenkkelvenenblut von 17 autopsierten Leichen mit unterschiedlicher Diagnose und postmortalen Lagerungszeiten von 10-120 h wurden mittels bewährten Methoden Granulozyten und Lymphozyten iso-

liert. Die Zellsuspensionen wurden morphologisch, enzymhistochemisch (Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase) sowie elektrophoretisch (PGM₁, PGM₃, GOT_M, PEPA, ME_M, FUCA) untersucht. Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

1. Erythrozytenfreie Zellsuspensionen sind nur während eines kurzfristigen postmortalen Intervalles zu erwarten.
2. Isolation reiner Lymphozyten aus Leichenblut ist mit der beschriebenen Methode nur während des sehr frühen postmortalen Intervalles (innerhalb von 10 h) möglich.
3. Bei der Granulozyten-Isolation kann ein auffällig hoher Prozentsatz eosinophiler Granulozyten beobachtet werden.
4. Der Prozentsatz Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-positiver Granulozyten ist im Vergleich mit Blutaussstrichen nach Lagerung von Blutkonserven deutlich geringer.
5. Elektrophoretisch lassen sich aus isolierten Granulozyten aller Leichen die oben aufgeführten Enzyme nachweisen.

Schlüsselwörter: Enzymaktivität, Leukozyten – Leichenblut, zytochemische Untersuchungen

Einleitung

Die Enzyme unterschiedlicher Körperflüssigkeiten, Gewebe und Organe während des postmortalen Intervalles wurden bereits intensiv untersucht (Übersichten – Serum: Oepen 1972; Muskulatur: Mallach 1963; Nervensystem: Oehmichen 1980; u. a.). Demgegenüber liegen bisher kaum Arbeiten über die Aktivität unterschiedlicher Enzyme in weißen Blutzellen vor. Über die Enzymaktivität in Lymphozyten- und Monozytenpopulationen wurde bereits berichtet (Siebert et al. 1982). Zytochemische Untersuchungen an weißen Blutzellen in Blutaussstrichen von Blutkonserven nach unterschiedlichen Lagerzeiten und Lagertemperaturen wurden von Oehmichen und Pedal (1983) vorgenommen. Zytochemische und zymographische Untersuchungen nach Zellisolierung aus Blutkonserven unterschiedlicher Lagerzeiten und Lagertemperaturen wurden von Kömpf et al. (1983) in Teil I dieser Arbeit beschrieben. Berg et al. (1981) berichteten ferner über den Einfluß der Blutprobenalterung auf das PGM₁- und Gc-Subtypenmuster. Hier sollen erste Ergebnisse über Befunde an weißen Blutzellen nach Isolierung aus Leichenblut während unterschiedlicher postmortalen Intervalle berichtet werden. Eine vergleichende Zusammenstellung aller hier zitierten Ergebnisse wurde an anderer Stelle wiedergegeben (Oehmichen und Kömpf 1983).

Material und Methoden

Es wurde Blut aus der Femoralvene von autopsierten Leichen entnommen und in EDTA-Röhrchen aufbewahrt. Die Todesursachen wurden in der Reihenfolge der postmortalen Liegezeit tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 1).

Zellisolierung

Die Isolierung der Granulozyten und Lymphozyten erfolgte entsprechend den im ersten Teil der Arbeit angegebenen Methoden (Kömpf et al. 1983). Die Isolierung erfolgte jeweils innerhalb der ersten 3 h nach der Autopsie.

Zytologische Untersuchung

Differentialblutbild. Nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung von Ausstrichpräparaten erfolgte die Zelldifferenzierung entsprechend hämatologischen Kriterien. Jeweils 100 Zellen wurden pro Präparat ausgezählt.

Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase (NAS-DCA Esterase). Die Enzym-Darstellung erfolgte entsprechend den Angaben von Leder (1964). Farbstoffpräzipitate als Hinweis auf eine Enzymaktivität lassen sich mit dieser Methode in Blutausstrichen ausschließlich in Granulozyten nachweisen. Der Anteil Enzym-positiver Granulozyten wurde durch Auszählen von 100 Granulozyten bestimmt.

Elektrophoretische Untersuchungen. Die elektrophoretische Aufarbeitung der Systeme PGM₁, PGM₃, GOT_M und ME_M erfolgte entsprechend Methoden, die im ersten Teil der Arbeit bereits aufgeführt wurden (Kömpf et al. 1983). Peptidase A (PEPA) wurde nach Angaben von Kömpf et al. (1979) dargestellt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen wurden in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Erythrozytenfreie Zellsuspensionen konnten im Rahmen der Zellisolierung nur von einer Leiche gewonnen werden, deren postmortale Liegezeit ca. 10 h betrug. Alle übrigen Präparate enthielten Erythrozyten in unterschiedlicher Anzahl, wobei die Anzahl offenbar zum Teil abhängig von der postmortalen Liegezeit schien. Eine Kontamination mit roten Blutzellen erwies sich somit als nahezu unvermeidbar.

Durch die hier angewendete Technik der Granulozytenisolation konnte bei Differenzierung der weißen Zellen in nahezu allen Fällen eine Suspension gewonnen werden, die mehr als 90% Granulozyten enthielt; bei den übrigen Zellen handelte es sich um mononukleäre Elemente, vorwiegend im Sinne von Lymphozyten. Unter den polymorphkernigen Zellen fiel ein vergleichsweise hoher Prozentsatz an eosinophilen Granulozyten auf (Abb. 1), der maximal 22% ausmachte. Ein Bezug zur Todesursache bzw. zum autoptischen Befund konnte nicht festgestellt werden; ebensowenig fand sich eine direkte Korrelation zu dem postmortalen Intervall.

Der Prozentsatz NAS-DCA Esterase positiver Granulozyten (Abb. 2a) nahm mit zunehmender postmortaler Liegezeit geringgradig ab (Abb. 2b). Auffällig war jedoch, daß selbst nach einer Liegezeit von 120 h noch 61% (von ursprünglich 70–80%) der Zellen einen positiven Enzymbesatz aufwies. Im vorliegenden Fall mag dieser Befund durch die Art des Todeseintrittes (Erfrieren) sowie die Lagerung der Leiche (bei Kälte) bedingt gewesen sein.

Eine reine Lymphozytenpopulation konnte nur aus dem Blut der Leiche mit einer Liegezeit von 10 h gewonnen werden. Bei einer Liegezeit von mehr als 20 h waren noch maximal ein Drittel der erfaßbaren Zellen morphologisch als

Tabelle 1. Zusammenstellung der Zelldifferenzierung und zytochemischen Befunde nach postmortalen Intervalle, Lebensalter und Todesursachen. Die Reihung erfolgt entsprechend der

No.	Chiffre	p.m.-Inter- vall (h)	Lebensalter (1)	Todesursache
1	310/80	10	70	Genickbruch
2	323/80	18	73	Coronarsklerose
3	35/81	21	20	Virusinfekt
4	307/80	24	16	Erwürgen
5	324/80	24	69	Coronarsklerose
6	41/81	28	39	Polytrauma
7	318/80	28	75	SHT
8	319/80	33	50	SHT
9	302/80	33	59	SHT
10	316/80	34	36	Verbluten
11	321/80	40	74	Coronarsklerose
12	305/80	42	44	Bronchial-Ca
13	311/80	43	42	Bolustod
14	296/80	43	46	Bronchopneum.
15	308/80	72	52	E 605-Intox.
16	322/80	80	52	Mundschuß
17	61/81	120	19	Erfrieren

– = Keine Erythrozyten vorhanden

+ = Einzelne Erythrozyten vorhanden

++ = Viele Erythrozyten (weniger als 10% der gesamten Zellen) vorhanden

+++ = Massive Durchsetzung des Präparates mit Erythrozyten

SHT = Schädel-Hirn-Trauma

Lymphozyten anzusprechen. Bei allen übrigen Zellen handelt es sich um polymorphkernige Leukozyten und Monozyten.

Elektrophoretisch konnten fast immer die Enzymsysteme PGM₁, PGM₃, GOT_M, PEPA, ME_M und FUCA nachgewiesen werden (Tabelle 2). Eine Ausnahme bildete der 1. Fall, der durch eine Liegezeit von nur 10 h gekennzeichnet war. Hier enthielt das Zellsediment nach Lymphozytenisolation 96% Lymphozyten. Aus dieser Suspension konnte keines der untersuchten Enzyme nachgewiesen werden. Der Nachweis der PGM₃- und PEPA-Genprodukte erwiesen sich, unabhängig von dem postmortalen Intervall, in manchen Fällen als problematisch.

Isolation von Granulozyten und Lymphozyten am Venenblut von Leichen unterschiedlicher Zunahme des postmortalen Intervalles

Zelldifferenzierung durch Auszählen von je 100 kernhaltigen Zellen/Präparat

Granulozyten-Isolation (%)			Lymphozyten-Isolation (%)		
Erythrozyten	Neutroph.	Eosinoph.	NAS-DCA Esterase-pos. Granulozyten	Erythrozyten	Lympho- zyten
-	91	4	71	-	96
+	82	14	85	+	72
+	79	10	51	+	32
++	84	11	69	++	26
+	76	22	77	+	19
++	75	17	61	++	15
+	77	11	70	+	34
+	82	8	81	+	15
+	76	7	72	+	21
++	77	12	68	++	11
+	75	17	44	+	23
+++	81	9	73	+++	18
++	78	9	45	++	28
++	87	7	65	++	11
+++	86	13	52	+++	8
+++	85	15	50	+++	11
++	87	11	61	++	7

Diskussion

Aus Leichenblut konnte nur in einem Fall ein erythrozytenfreies Sediment gewonnen werden. In den meisten Fällen jedoch betrug die Kontamination mit Erythrozyten weniger als 10%. Wie im Teil I der vorliegenden Arbeit (Kömpf et al. 1982) ausgeführt wurde, kommen die Enzymsysteme PGM_3 , GOT_M , ME_M , PEPA und FUCA in Erythrozyten nicht vor. Die nachgewiesenen Enzymaktivitäten sind demzufolge auf den Gehalt an weißen Blutzellen zurückzuführen. Der Nachweis von PGM_3 in menschlichen Erythrozyten wurde zwar beschrieben (Bissbort et al. 1975), war jedoch abhängig von der dreifachen Menge verwendeten Blutes und erfolgte an Vollblut, bzw. besonders gut an Blutkuchen. Es liegt die Vermutung nahe, daß auch bei dieser Untersuchung der leukozytäre Enzymbesatz bestimmend für den erfolgreichen Nachweis war; eine Schlußfolgerung, die für die Praxis unerheblich schien.

Während die Isolation der Granulozyten während des untersuchten Intervalles weitgehend erfolgreich vorgenommen werden konnte, erwies sich die Iso-

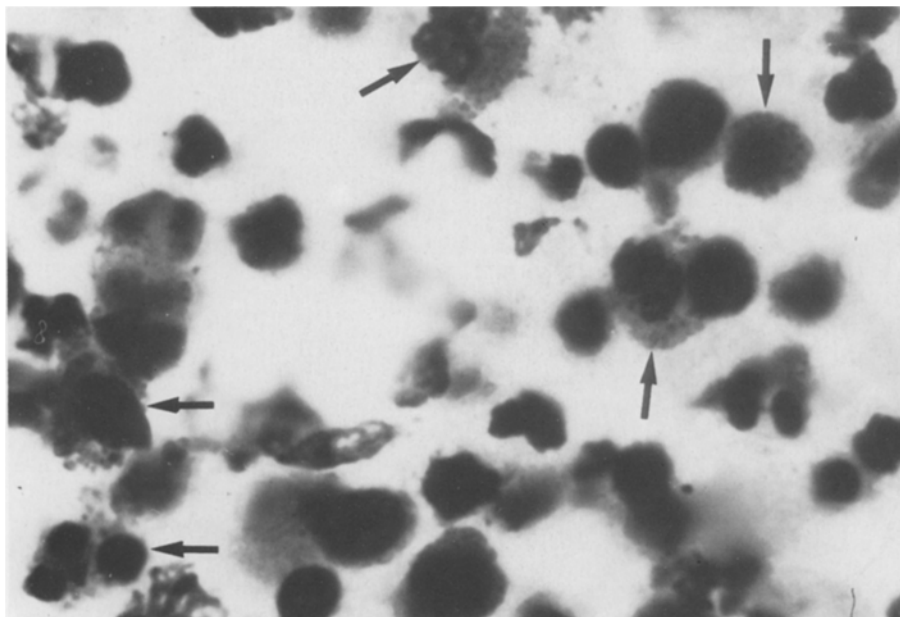


Abb. 1. Granulozytenisolation, wobei überraschend zahlreiche eosinophile Granulozyten (*Pfeile*) erkennbar werden. May-Grünwald/Giemsa, $\times 1200$

lation von reinen Lymphozyten mit der angewendeten Methode als nicht möglich. Insofern konnte durch die vorliegende Untersuchung kein vergleichender Enzymnachweis in Granulozyten und Lymphozyten durchgeführt werden.

Die morphologische Untersuchung der Zellsedimente lieferte weitgehend identische Beobachtungen zu früheren Untersuchungen an Blutausstrichen nach Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen (Oehmichen und Pedal 1983). Hier jedoch wurden häufiger die Ringstrukturen der Granulozyten mit zentraler Aufhellung beobachtet, so daß die Zellen zunächst wie Fettzellen oder Siegelringzellen imponierten. Bei einer Fettfärbung konnte jedoch kein Fett nachgewiesen werden; die Darstellung der NAS-DCA Esterase ergab, daß das Zentrum enzymfrei war, während der Ring durch Chromatinbestandteile und Enzym-positive Plasmastrukturen gebildet wurde. Da der Prozentsatz an Ringstrukturen auch nach Zellisolation aus sterilen Blutkonserven (vgl. Kömpf et al. 1983) deutlich geringer war, müssen hydropische Veränderungen angenommen werden, die unter den Lagerungsbedingungen in der Leiche besonders ausgeprägt wirksam werden.

Der Nachweis von vergleichsweise vielen eosinophilen Granulozyten könnte einerseits für eine agonale Ausschwemmung dieser Zellpopulation aus dem Knochenmark sprechen; eine selektive Ausschwemmung dieser Zellpopulation in reifen Stadien ohne gleichzeitige Ausschwemmung von Blasten anderer Zellpopulationen ist jedoch unwahrscheinlich. Demgegenüber könnte die vergleichsweise gute Haltbarkeit der Eosinophilen (Hayhoe und Quaglino 1980; Penttilä und Laiho 1981) ihre relative Zunahme erklären, unter der Annahme eines gleichzeitigen Verlustes von neutrophilen Granulozyten infolge Antolyse.

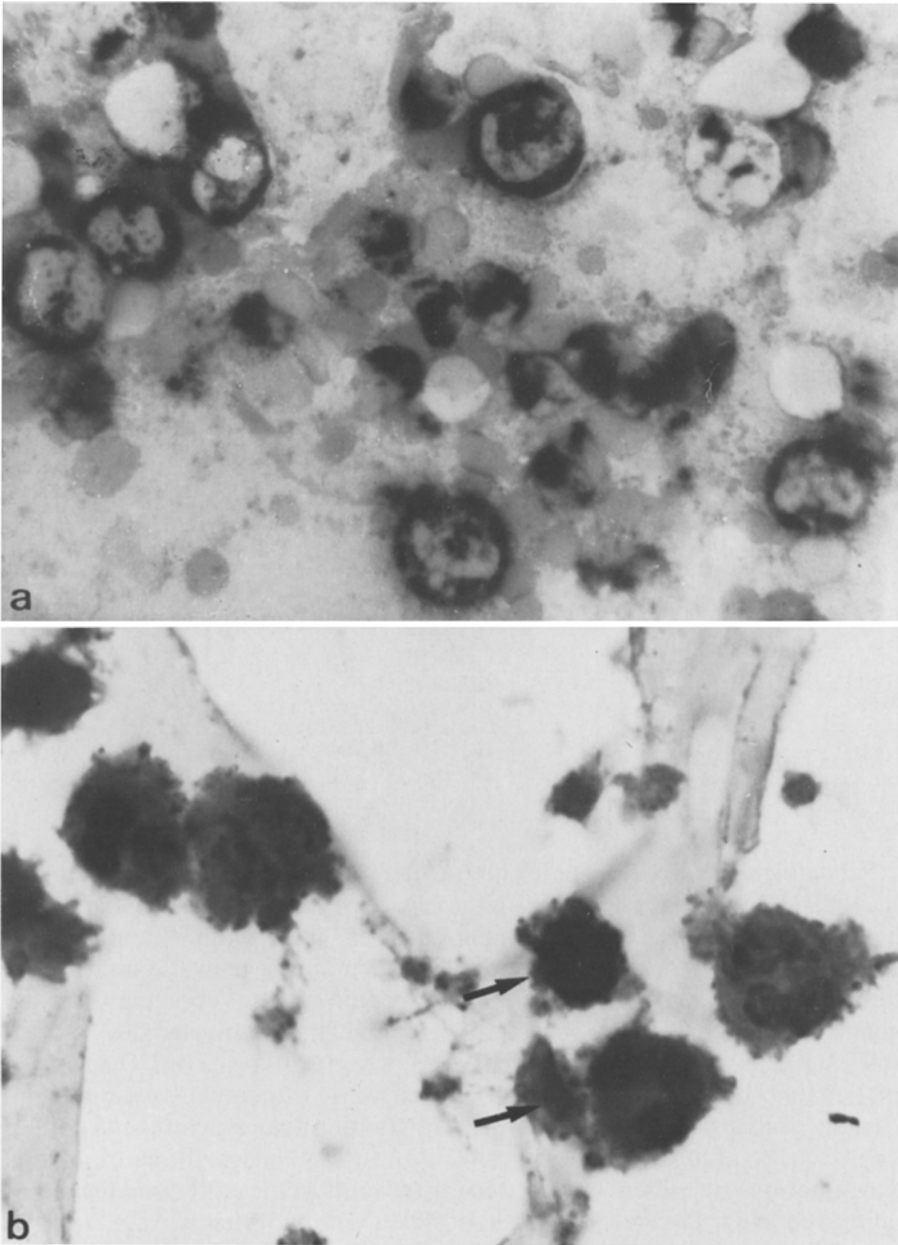


Abb. 2a, b. Naphthol-AS-D Chlorazetat Esterase-Darstellung: **a** Erkennbar werden zahlreiche Enzym-aktive Zellen neben Enzym-negativen Lymphozyten und einzelnen Erythrozyten. NAS-DCA Esterase ohne Gegenfärbung, $\times 1200$. **b** Unterschiedliche Aktivität des Enzyms in neutrophilen Granulozyten, wobei Enzym-positive Zellen (*Pfeile*) von Enzym-negativen Zellen (restliche Zellen) unterschieden werden können. NAS-DCA Esterase/Hämalaun, $\times 1200$

Tabelle 2. Wiedergabe der Phänotypen, die in isolierten Granulozyten aus Leichenblut nachweisbar wurden. Die No. beziehen sich auf die selben Fälle, die in Tabelle 1 numeriert aufgeführt wurden

No.	Hämo-lyse	Enzyme					
		PGM ₁	PGM ₃	GOT _M	PEPA	ME _M	FUCA
1		1	2-1	2-1	8-1	2-1	2-1
2		1	./.	1	./.	1	2-1
4		2-1	1	1	8-1	2-1	2-1
5		1	./.	1	./.	1	1
7		1	./.	1	1	1	./.
8		2-1	1	1	8-1	1	2-1
9		2-1	1	—	1	2	1
10		1	./.	1	1	1	1
11		2	2-1	1	1	2	2-1
12	+	2-1	1	./.	./.	./.	—
13		1	./.	1	1	1	1
15	+	1	1	1	8-1	2-1	1
16	+	1	2-1	1	./.	1	1
17		1	2-1	./.	1	1	1

+ = Vorhanden

./. = Untersucht, ohne positiven Befund

— = Nicht untersucht

Schließlich fällt bei den vorgelegten Untersuchungen auf, daß der Prozentsatz NAS-DCA Esterase-positiver Zellen erheblich schwankte. Geht man davon aus, daß der Prozentsatz bei Lebenden vergleichsweise stabil ist und etwa bei 90% liegt, dann überrascht die Streuung, die zumindest teilweise auftritt und offenbar unabhängig von der postmortalen Lagerung ist. Vergleicht man den beobachteten Anteil Enzym-positiver Zellen mit den Mittelwerten des Prozentsatzes in Blutaussstrichen nach steriler Lagerung von Blutkonserven (Oehmichen und Pedal 1983), so stellt man einen vergleichsweise frühen Verlust der Enzymaktivität im Blut der Leichen fest. Bei den zitierten Untersuchungen konnten noch nach 6 Tagen Lagerung bei 20°C im Mittel 97% der Granulozyten als Enzym-positiv angesehen werden. Möglicherweise ist dieser Befund technisch bedingt, denn der Prozentsatz Enzym-positiver Granulozyten, die aus steril gelagerten Blutkonserven isoliert worden waren, ist vergleichsweise niedrig (45% bei einer Lagerung von 6 Tagen bei 20°C).

Im Schrifttum über postmortale Untersuchungen von Blutzellen liegen Befunde über die Viabilität von weißen Blutzellen vor (vgl. Literaturübersicht bei Oehmichen und Pedal 1983). Zytochemische Befunde erhoben u. a. auch Nanikawa und Janssen (1965) durch Nachweis der Bernsteinsäuredehydrogenase-Aktivität in Leukozyten. Die Autoren stellten bei Lagerung der Leiche bei einer Temperatur von 20°C eine Aktivitätsabnahme dieses Enzyms bereits

am 2. postmortalen Tag fest. Im Tierexperiment konnten sie eine gleichbleibende Enzymaktivität über 7 Tage beobachten, wenn die Leiche bei 0°C gelagert wurde.

Findley (1977) stellte nach Untersuchung der PAS- und Peroxidase-Reaktionen sowie der alkalischen Phosphate in Knochenmarkszellen während des postmortalen Intervalles fest, daß bei intakter Morphologie keine Änderung der Enzymaktivität bzw. der Reaktivität nachweisbar wird. Diesen Befund konnten wir allerdings bei Untersuchung von postmortal gewonnenen Blutzellen und bei Untersuchung von weißen Blutzellen in Blutkonserven nach steriler Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen nicht bestätigen.

Der elektrophoretische Nachweis polymorpher Enzymsysteme aus menschlichen Geweben wurde im Rahmen von forensischen Untersuchungen schon mehrfach vorgenommen. Eine Übersicht über das Schrifttum bis zum Jahre 1972 gibt Oepen (1972). Es besteht heute kein Zweifel daran, daß an postmortalem Gewebe der Nachweis von verschiedenen PGM-Phänotypen (Oepen 1972, 1973; Kömpf und Wirth 1972; Tutsch-Bauer et al. 1981) möglich ist. Ferner wurden die Adenylatkinase (AK)- und Adenosindesaminasen (ADA)-Systeme an Leichenmuskulatur bestimmt (Kömpf und Wirth 1972; Oepen und Mertens 1974). Vergleichbare Untersuchungen an isolierten Granulozyten aus Leichenblut liegen bisher nicht vor. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß die Enzyme GOT_M, ME_M, ME_S, FUCA und PEPA mindestens innerhalb eines postmortalen Intervalles von 120 h in diesen Zellen nachweisbar sind.

Literatur

- Berg S, Ladiges M-L, Ladiges O (1981) Der Einfluß von Blutproben- und Spurenalterung auf das PGM₁- und Gc-Subtypenmuster. *Z Rechtsmed* 87: 85-94
- Bissbort S, Kömpf J, Bethge R, Gussmann S (1975) Population genetics of human red cell phosphoglucomutase isozyme PGM₃ (E.C.: 2.7.5.1). *Humangenetik* 27: 57-58
- Findlay AB (1977) Bone marrow changes in the post mortem interval. *J Forens Sci Soc* 16: 213-218
- Hayhoe FGJ, Quaglini D (1980) *Haematological cytochemistry*. Churchill-Livingstone, Edinburgh London New York
- Kömpf J, Wirth E (1972) Identifizierung einer unbekanntenen Leiche durch vergleichende Isoenzymbestimmungen aus Blut und Muskulatur. *Arch Kriminol* 150: 49-50
- Kömpf J, Siebert G, Ritter H (1979) Common polymorphism of peptidase A: formal genetics and population data. *Hum Genet* 51: 323-325
- Kömpf J, Oehmichen M, Schmidt V (1983) Enzymaktivität isolierter Leukozyten. I. Zytochemische und zymographische Untersuchungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. *Z Rechtsmed* (im Druck)
- Leder LD (1964) Über die selektive fermentcytochemische Darstellung von neutrophilen myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt. *Klin Wochenschr* 42: 553
- Mallach H-J (1963) Über histochemisch nachweisbare Phosphatasen in den kontraktilelementen der Skelettmuskelfasern und ihre Veränderungen nach dem Tode. *Habilitationsschrift*, Berlin
- Nanikawa R, Janssen W (1965) Über das post-mortale Verhalten der Succino-dehydrogenase-Aktivität in Geweben und Leukozyten. *Dtsch Z Gerichtl Med* 56: 44-56
- Oehmichen M (1980) Enzyme alterations in brain tissue during the early postmortal interval with reference to the histomorphology: Review of the literature. *Z Rechtsmed* 85: 81-95

- Oehmichen M, Kömpf J (1983) Die Enzymaktivität weißer Blutzellen nach unterschiedlicher Lagerzeit und -temperatur. Vergleichende zytochemische und zymographische Untersuchungen an Blutaussstrichen und Blutzellisolation aus Blutkonserven und Leichenblut. In: Barz J, et al (Hrsg) Fortschritte der Rechtsmedizin. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 156-168
- Oehmichen M, Pedal I (1983) Zytochemie weißer Blutzellen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Beitr Gerichtl Med (im Druck)
- Oepen I (1972) Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe. Habilitationsschrift, Marburg
- Oepen I (1973) AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an Haut, Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von Leichenteilen. Beitr Gerichtl Med 31 : 300-306
- Oepen I, Mertens G (1974) Bestimmung der Adenylatkinase (AK)- und Adenosindesaminase (ADA)-Typen an Leichenmuskulatur. Beitr Gerichtl Med 32 : 148-151
- Penttilä A, Laiho K (1981) Autolytic changes in blood cells of human cadavers. II. Morphological studies. Forensic Sci Int 17 : 121-132
- Siebert G, Oehmichen M, Kömpf J (1982) Enzyme activity in human mononuclear blood cells. Z Rechtsmed 88 : 75-78
- Tutsch-Bauer E, Oya M, Tröger HD (1981) PGM₁-Fokussierung an frischen menschlichen Körpergeweben und nach Lagerung. Forensic Sci Int 18 : 251-252

Eingegangen am 11. November 1982