

Postmortale DNS- und RNS-Synthese: Erste Untersuchungen an menschlichen Leichen *

M. Oehmichen¹ und K. Zilles²

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

² Anatomisches Institut der Universität Köln,
Joseph-Stelzmann-Str. 9, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Postmortem DNA and RNA Synthesis: Preliminary Investigations with Human Cadavers

Summary. Postmortem DNA and RNA synthesis was detected in tissue specimens harvested from two cadavers at different intervals between 2.5 and 32 h postmortem. Each tissue specimen was incubated for 1 h in a ³H-thymidine or ³H-cytidine solution. DNA- as well as RNA-synthesizing cells were found in skin tissue and bone marrow throughout the interval investigated. Cytidine incorporation decreased progressively during the course of the postmortem interval. DNA and RNA synthesis was also observed in cells of the testis, which were predominantly spermatogonia cells in the case of DNA. Low-grade RNA synthesis was detected in bowel epithelial cells up to 2.5 h postmortem; DNA synthesis was not present during the interval investigated. No supravital phenomena were observable in the splenic tissues examined.

Key words: Supravital phenomena, autoradiography - DNA synthesis - RNA synthesis

Zusammenfassung. Zum Nachweis der postmortalen DNA- und RNS-Synthese wurden von zwei Leichen Gewebeproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Tode entnommen. Die Intervalle betragen mindestens 2,5 Std, maximal 32 Std. Die Gewebeproben wurden jeweils in Lösungen für 1 Std inkubiert, die entweder ³H-Thymidin oder ³H-Cytidin enthielten. Es konnte festgestellt werden, daß in Haut und Knochenmark innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes sowohl DNA- als auch RNS-Synthese stattfand. Die Menge inkorporierten Cytidins schien mit zunehmendem Intervall abzunehmen. DNA-Synthese wurde ferner bis zu einem maximalen Intervall von 8 Std in Hodenzellen, vorwiegend in Spermatogonien, angetroffen. Während des gleichen Zeitraumes war auch eine RNS-Synthese in Hodenzellen zu beobachten. Darmepithelien zeigten ausschließlich während eines Intervalles bis zu maximal 2,5 Std eine geringe RNS-Syn-

* Herrn Prof. Dr. H.-J. Wagner zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet
Sonderdruckanfragen an: Prof. Dr. M. Oehmichen (Adresse siehe oben)

these, zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine DNS-Synthese. Soweit Milzgewebe untersucht wurde, waren hier keine supravitalen Phänomene nachweisbar.

Schlüsselwörter: Supravitale Phänomene, Autoradiographie – DNS-Synthese – RNS-Synthese

In der Anatomie, Pathologie und Immunologie wurde Ende der 50er Jahre die Autoradiographie als Methode eingeführt (Schultze 1968). In vivo oder in vitro angebotene radioaktiv-markierte Substanzen können als Vorläufer in zelleigene Synthesewege eingeschleust und dann nachgewiesen werden. Der Nachweis kann am Schnittpräparat nach Routineeinbettung in Paraffin durch Überziehen des entparaffinierten Schnittes mit einer Fotoemulsion erfolgen. Der Film wird bei Vorhandensein lokaler Radioaktivität (meist β -Strahlung) lokal belichtet. Der Nachweis reduzierter Silberkörner durch fotografische Entwicklung erlaubt somit die Schlußfolgerung, daß die entsprechende Substanz an diesem Ort, in dieser Zelle, eingebaut wurde.

In der forensischen Pathologie stellt sich unter anderem die Frage nach dem Vorhandensein supravitaler Phänomene. Sowohl qualitative als auch quantitative Abweichungen von einer Norm könnten jeweils ein Anzeichen für bestimmte, von außen einwirkende Noxen darstellen.

Die vorliegende Untersuchung gibt erste Erfahrungen und Ergebnisse einer Studie wieder, die in größerem Umfang durchgeführt werden soll. Es soll zu der Frage der postmortalen DNS- und RNS-Synthese Stellung genommen werden.

Material und Methoden

Das Untersuchungsmaterial stammt von zwei Leichen, deren Todeszeitpunkt bekannt war. Ihre Lagerung erfolgte bei Zimmertemperatur. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde Gewebe in Blöcken von 2 mm^3 entnommen und in radioaktive Inkubationslösung gelegt.

Leichen

1. Nr. 581/83: 42jähriger Mann, der durch Verbluten infolge Herzstichs zu Tode kam. Die Probenentnahmen erfolgten nach 11, 17 und 32 Std.
2. Nr. 611/83: 79jähriger Mann, dessen Tod infolge eines Herzinfarktes eintrat. Die Probenentnahme erfolgte nach 2,5, 8 und 22 Std.

Entnommene Organproben

Die Leichen wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes möglichst intakt gelassen; insbesondere die Haut und das Darmkonvolut wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle (um an die Milz zu gelangen) jeweils wieder voll reponiert. Bei beiden Leichen wurde Haut- (Brustbereich), Darm- (Jejunum), Milz- und Hodengewebe entnommen. Im zweiten Fall wurde zusätzlich Knochenmark (Brustbein) inkubiert.

Inkubation

Sofort nach der Entnahme wurden die Proben in Reagenzgläser mit radioaktiver Lösung gelegt und diese luftdicht abgeschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 min.

Inkubationslösung

Jeweils eine Probe des gleichen Organs wurde zum gleichen Zeitpunkt in eine der zwei aufgeführten Lösungen gegeben:

Lösung 1: ^3H -Thymidin (Amersham-Buchler, D-3300 Braunschweig, spezifische Aktivität: 5,0 Ci mM) in einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{Ci/ml}$, gelöst in 1 ml Medium Tc 199 (Kulturmedium, Serva Feinbiochemica, D-6900 Heidelberg).

Lösung 2: ^3H -Cytidin (Amersham-Buchler, D-3300 Braunschweig, spezifische Aktivität 2,0 Ci mM) in einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{Ci/ml}$, gelöst in 1 ml Medium Tc 199.

Histologische Aufarbeitung

Nach der Inkubation wurde das Gewebe in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μm dicke Schnitte wurden entparaffiniert.

Autoradiographische Aufarbeitung

Die Schnitte wurden entsprechend der Dipping-Methode behandelt: Verwendung fand der Film Kodak NTB 2. Die Exposition erfolgte bei 4°C unter Lichtabschluß über Silika-Gel. Die Expositionszeit betrug 7 bzw. 14 Tage. Die Entwicklung erfolgte bei 20°C in Kodak D-19 für 2 min. Fixierung im handelsüblichen Fixierbad (Kodak Ektaflo fixer). Anschließend Wässerung und Färbung mit Kernechtrot.

Ergebnisse*Übersicht*

Die Ergebnisse sind tabellarisch, für die DNS- und RNS-Synthese (Tabellen 1 und 2) jeweils gesondert, dargestellt.

In der Haut war in beiden Fällen, im Knochenmark in dem einen untersuchten Fall, über den gesamten Untersuchungszeitraum sowohl eine DNS- als auch eine RNS-Synthese nachweisbar. Im Hoden war nur im zweiten Fall während eines postmortalem Intervalles von maximal 8 Std sowohl eine DNS- als auch eine RNS-Synthese zu beobachten. Demgegenüber fanden wir im Darm nur

Tabelle 1. Nachweis von DNS-synthetisierenden Zellen während des postmortalen Intervalles in unterschiedlichen Organen

Organe	Fall 1			Fall 2		
	h.p.m.			h.p.m.		
	11	17	32	2,5	8	22
Haut	+	+	+	+	+	+
Darm	—	—	—	—	—	—
Milz	—	—	—	0	0	—
Hoden	—	—	—	+	+	—
Knochenmark	0	0	0	+	+	+

h.p.m. = Std postmortem

+ = DNS-Synthese nachgewiesen

— = DNS-Synthese nicht nachgewiesen

0 = nicht untersucht

während dem ersten 2,5 Std-Intervall des zweiten Falles einen diskreten Cytidin-Einbau; in der Milz wurde zu keinem Untersuchungszeitpunkt Thymidin oder Cytidin eingebaut. Allerdings ist anzumerken, daß das Milzgewebe im Fall 2 während der kurzen Intervalle von 2,5 und 8 Std nicht untersucht wurde.

DNS-Synthese

Die Verteilung der DNS-synthetisierenden Zellen in der *Haut* war offenbar methodisch bedingt: Sie fanden sich in der Randzone der Hautproben. Offenbar kam es nicht zu einer ausreichenden Diffusion der radioaktiven Lösung in die

Tabelle 2. Nachweis von RNS-synthetisierenden Zellen während des postmortalen Intervalles in unterschiedlichen Organen

Organe	Fall 1			Fall 2		
	h.p.m.			h.p.m.		
	11	17	32	2,5	8	22
Haut	+	+	+	+	+	+
Darm	—	—	—	+	—	—
Milz	—	—	—	0	0	—
Hoden	—	—	—	+	+	—
Knochenmark	0	0	0	+	+	+

h.p.m. = Std postmortem

+ = RNS-Synthese nachgewiesen

— = RNS-Synthese nicht nachgewiesen

0 = nicht untersucht

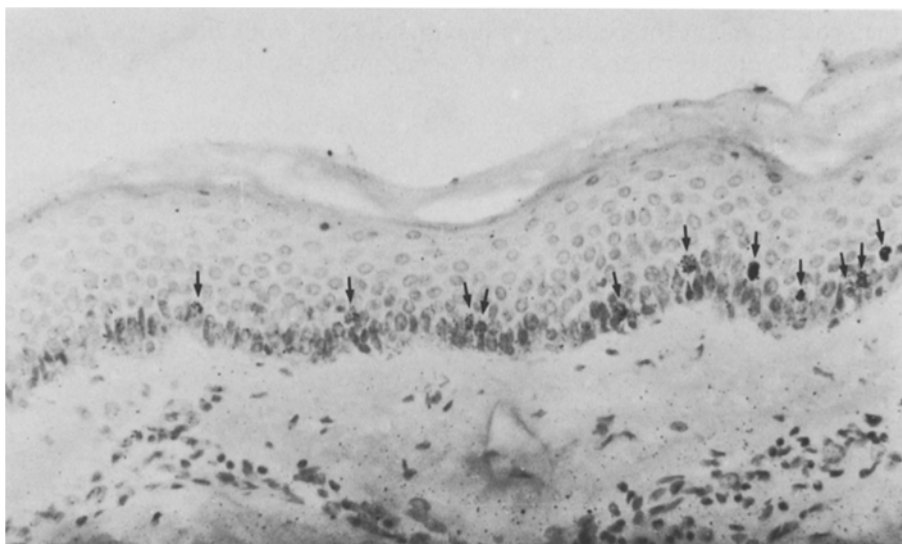


Abb. 1. DNS-synthetisierende Zellen der Randregion des Schnittes durch die Haut (*rechts*) (Stratum germinativum), entnommen 32 Std postmortem (Vergrößerung: 200 ×)

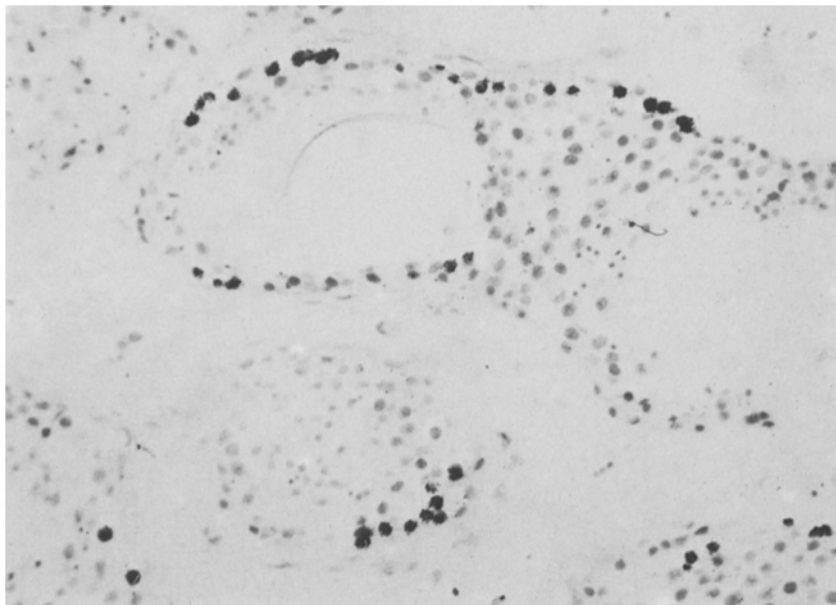


Abb. 2. DNS-synthetisierende Zellen im Hoden, vorwiegend im Sinne von Spermatogonien, entnommen 2,5 Std postmortem (Vergrößerung: 500×)

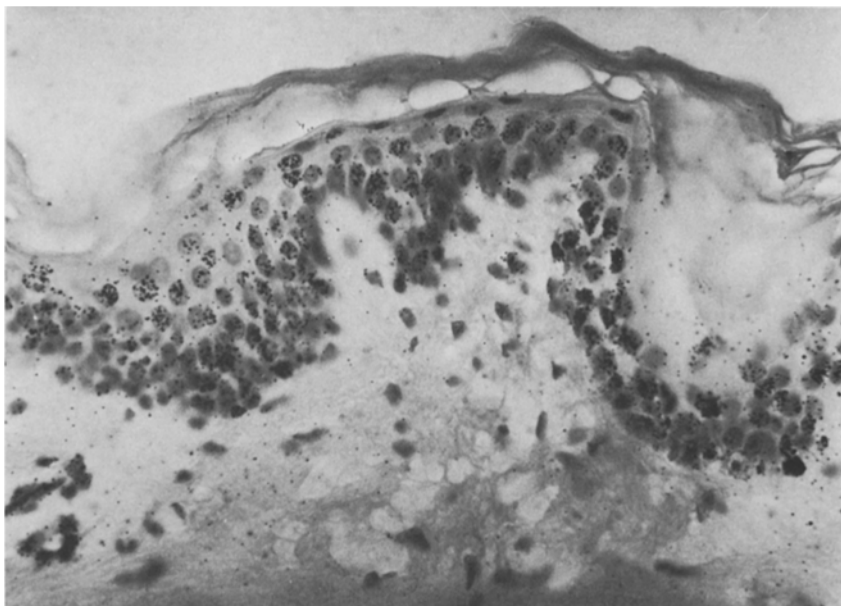


Abb. 3. RNS-synthetisierende Zellen in der Haut - vorwiegend im Stratum germinativum, entnommen 32 Std postmortem (Vergrößerung: 500×)

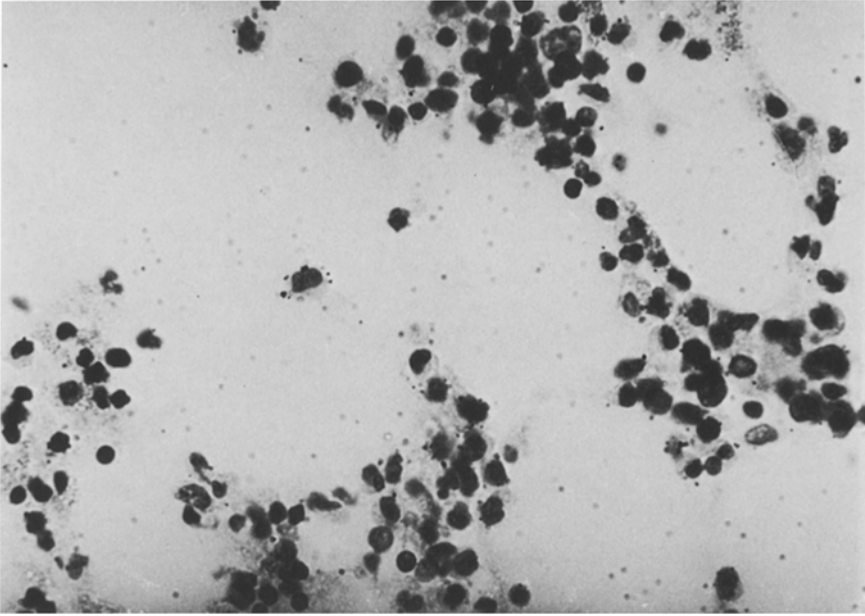


Abb. 4. RNS-synthetisierende Zellen im Knochenmark, entnommen 32 Std postmortem (Vergrößerung: 500×)

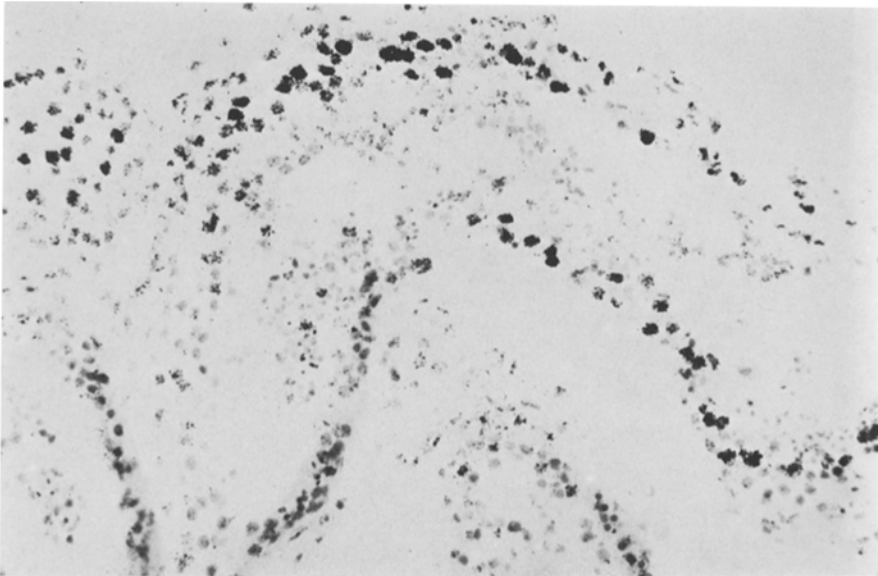


Abb. 5. RNS-synthetisierende Zellen im Hoden, vorwiegend im Sinne von Spermatogonien, entnommen 8 Std postmortem (Vergrößerung: 285×)

mittleren Anteile des Probenstückes. Markiert waren nahezu ausschließlich Zellen des Stratum germinativum (Abb. 1), unter besonderer Betonung des Stratum basale. Vor allem bei kurzen Intervallen fanden sich auch einzelne markierte Zellen in den Drüenschläuchen sowie im Corium, im Sinne von Fibroblasten und Endothel-Zellen.

Eine Bestimmung des Markierungsindex, d. h. des Prozentsatzes markierter Zellen im Vergleich zu nicht markierten Zellen, erübrigte sich insofern, als offenbar diffusionsbedingte Artefakte vorlagen. Eindrucksmäßig bestand jedoch keine Abnahme markierter Zellen in Abhängigkeit vom postmortalen Intervall.

Im *Knochenmark* fanden sich demgegenüber in allen Gewebeanteilen markierte Zellen als Hinweis für einen Thymidineinbau. Das locker strukturierte Gewebe erlaubte offenbar eine weitaus bessere Diffusion der radioaktiven Flüssigkeit. Bei der gegebenen Kernfärbung war jedoch eine Differenzierung der Zellen nicht möglich.

Am *Hoden* wiesen vor allem die Spermatogonien eine DNS-Synthese auf (Abb. 2). Andere Zellen waren nur vereinzelt markiert. Auch hier zeigte sich eine gewisse Abhängigkeit der Markierungsintensität von der Entfernung der Zellen von der Gewebe-Block-Oberfläche.

RNS-Synthese

RNS-synthetisierende Zellen fanden sich in allen Zellen des Stratum germinativum der *Haut* (Abb. 3), wobei auch hier diffusionsabhängige quantitative Unterschiede bestanden. Die Menge inkorporierten radioaktiven Cytidins war offensichtlich abhängig vom zeitlichen Intervall, da mit zunehmendem Intervall die Anzahl reduzierter Silberkörner pro Zelle geringer wurde.

Identisch waren die Verhältnisse im *Knochenmark* (Abb. 4). Im *Hoden* (Abb. 5) waren nach 2,5 Std Intervall nahezu alle Zellen markiert, während nach 8 Std Intervall nur noch lokal begrenzt Gruppen markierter Zellen zu beobachten waren. Der *Darm* zeigte bei einem 2,5stündigen Intervall eine geringe, aber eindeutige Verdichtung reduzierter Silberkörner pro Zelle. Im Vergleich mit der Anzahl reduzierter Silberkörner in der Haut nach einem 32stündigen Intervall war die Anzahl deutlich geringer, als Hinweis darauf, daß die Darmepithelien schon zu diesem Zeitpunkt eine geringere Syntheserate aufweisen.

Diskussion

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Als supravitales Phänomen muß die DNS- und RNS-Synthese, insbesondere in der Haut und im Knochenmark, angesehen werden.
2. Die Einbauraten angebotener radioaktiver Aminosäuren hängt von der Dicke der Gewebeblöcke ab.

Möglicherweise sind für die Einbauraten auch andere Faktoren ausschlaggebend, insbesondere die Technik der Inkubation (vgl. Schultze 1968). Aus praktischen Erwägungen verzichteten wir darauf, aufwendigere Techniken anzuwen-

den, wie z. B. ständige Sauerstoffzufuhr und ähnliches, da wir zunächst prinzipiell über die Möglichkeiten der postmortalen Synthesevorgänge eine Information benötigen.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

Der Einbau von ^3H -Thymidin läßt annehmen, daß die markierten Zellen zum Zeitpunkt der Inkubation DNS-synthetisierten. Sie befinden sich mithin zu diesem Zeitpunkt in der sogenannten Synthese-Phase (S-Phase), die der prämitotischen Ruhepause vorausgeht. Alle synthetisierenden Zellen verdoppeln zu diesem Zeitpunkt ihre DNS, um sich zu einem späteren Zeitpunkt zu teilen bzw. auf eine entsprechende Teilung vorzubereiten.

Auffallend ist die große Anzahl an DNS-synthetisierenden Zellen gegenüber der geringen Anzahl von Zellen, die in der Mitose angetroffen werden. Dieses unterschiedliche Verhältnis resultiert daraus, daß die DNS-Phase mehrere Stunden dauert (7–8 bis maximal 18–26 Std), während die Mitose-Phase in der Regel nur 30–90 min dauert.

Die RNS-Synthese gibt in gewissen Grenzen eine Auskunft über die Funktionsfähigkeit der Zellen, d. h. über ihre Vitalität. Entsprechend kann man davon ausgehen, daß ein Großteil der Zellen in Haut und Knochenmark postmortal noch relativ lang vital sind.

Sowohl die DNS- als auch die RNS-Synthese sind Vorgänge, die Energie- und Sauerstoff-abhängig sind. Möglicherweise erklärt sich hieraus das unterschiedliche Verhalten verschiedener Gewebeproben, je nachdem wie oberflächennahe sie gelegen sind.

Die Anwendbarkeit autoradiographischer Methoden an postmortalem Gewebe ist seit längerem bekannt. Lindner (1967) beschrieb Untersuchungen über den Sulfateinbau in die Leichenhaut. Diese vor den Rechtsmedizinern vorgetragenen Beobachtungen nahmen Berg und Mitarb. (1974) zum Anlaß, systematische Untersuchungen über den Einbau dieser Substanz während des postmortalen Intervalles durchzuführen. Sie fanden noch nach 40 Std Intervall einen Einbau von Sulfat. Schellmann und Schell (1980) berichteten schließlich über die DNS-Synthese von Hautzellen zweier Ratten während eines postmortalen Intervalles von maximal 24 Std.

Die Eindeutigkeit aller genannten Beobachtungen läßt annehmen, daß unter pathologischen Bedingungen entsprechend anders geartete Verhältnisse entstehen, die auch als Nachweis für pathologische Vorgänge zu deuten wären. Hieraus läßt sich folgern, daß weitere Untersuchungen sinnvoll sein dürften.

Literatur

- Berg S, Bode G, Sekardi L (1974) Radiochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel von Leichenhaut in der Supravitalphase. *Beitr Gerichtl Med* 32 : 280–285
 Lindner J (1967) Vitale Reaktionen. *Z Gerichtl Med* 59 : 312–344
 Schellmann B, Schell H (1980) Histoautoradiographische Untersuchungen zur postmortalen Proliferation in der Epidermis der Ratte. *Beitr Gerichtl Med* 38 : 199–201
 Schultze B (1968) Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zellen im Autoradiogramm. In: Altmann HW et al. (Hrsg) *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, Bd 2, Teil 5 (Die Zelle), S 466–670