

Enzymaktivität von Leukozyten aus Schnittwunden der Haut mit verschiedener Wundaltersbestimmung

Iwan Lasarov

Lehrstuhl für Gerichtsmedizin an der Medizinischen Hochschule in Varna,
Marin Drinovstrasse 55, 9002 Varna, Bulgarien

Leukocyte Enzyme Activity in Skin Cut Wounds at Various Time Intervals After Injury

Summary. A study was carried out on leukocyte enzyme activity from prints of skin cut wounds of guinea pigs at various time intervals after the injury. The following enzymes were examined: alkaline and acid phosphatase, succine, lactate, and glucose-6-phosphate dehydrogenases. Cytochemical analysis revealed a rapid increase in enzyme activity in the 4th h after the wound occurred, which can be explained by the alteration in leukocyte metabolism induced by the damaging agent, i.e., the skin trauma inflicted. The rise in lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity is the most characteristic feature. In accordance with these changes in enzyme activity, some conclusions can be made about certain intracellular alterations. There is a close relationship between the course and the degree of these cellular changes and the time interval between the injury and examination of the enzyme activity. These changes make it possible to draw conclusions concerning the vital character and the interval after inflicting as well.

Key words: Skin cut wounds, leukocyte enzyme activity – Time duration after injury

Zusammenfassung. Es wurde eine Untersuchung der Enzymaktivität der alkalischen und sauren Phosphatase, der Sukzinat- und Laktatdehydrogenase, und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in den Leukozyten von Abdrücken von Hautschnittwunden bei Meerschweinchen nach verschiedenen Zeitabschnitten nach Verletzung durchgeführt. Die zytochemische Analyse zeigt eine merkliche Steigerung der Aktivität der untersuchten Enzyme um die vierte Stunde nach der Verletzung der Haut. Diese Steigerung der Enzymaktivität wird auf die eingetretene Umwandlung des normal verlaufenden metabolischen Prozesses in den Leukozyten, hervorgerufen durch

die Einwirkung eines schädigenden Agents – der Verletzung der Haut – zurückgeführt. Am demonstrativsten ist diese Steigerung der Enzymaktivität bei der Laktatdehydrogenase und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase. Auf Grund der Veränderungen in der Aktivität der untersuchten Enzyme kann man Schlußfolgerungen auf die sich entwickelnden Veränderungen in der Zelle selbst ziehen. Die Entwicklung und der Grad dieser Veränderungen stehen in enger Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit von dem Moment der Schädigung bis zum Moment der Untersuchung der entsprechenden Enzymaktivität. Aus diesen Veränderungen kann man sowohl darauf schließen, ob die Verletzung zu Lebzeiten geschah, als auch auf die Zeitdauer ihres Bestehens.

Schlüsselwörter: Schnittwunden der Haut, Enzymaktivität der Leukozyten – Wundaltersbestimmung

Die Erforschung der Veränderungen im inneren der Zelle im Verlauf der Einwirkungen durch ein schädigendes Agens eröffnet Möglichkeiten zur Information sowohl über den Charakter der Einwirkung selbst, als auch über ihre Dauer. Diese Veränderungen in der Zelle sind für die lebende Materie charakteristisch und können zur Lösung einer der wesentlichsten Fragen in der Gerichtsmedizin – der Bestimmung, ob Wunden, einschließlich der Haut, zu Lebzeiten zugefügt wurden und besonders, wie lange sie schon bestehen – herangezogen werden. In diesen Veränderungen drückt sich die Reaktion der lebenden Zelle auf die in ihr und um sie herum entstandenen äußerst ungünstigen Bedingungen aus. Im Verlauf der Entwicklung dieses eigentümlichen Existenzkampfes der Zelle treten akute und tiefgreifende Umwandlungen auf, vor allem in ihren Stoffwechselprozessen, durch deren Umbau die Zelle Wege sucht, um die ungünstigen Bedingungen zu überwinden, in die sie geraten ist. In ihrer derzeitigen Entwicklungsetappe kann die Zytoenzymchemie nicht nur die bereits bekannten biochemischen Methoden mit konkreter Lokalisation der untersuchten Reaktion realisieren und empfindlicher gestalten, sondern sie kann auch den Umbau des Metabolismus im Zellinneren der konkreten Zelle darstellen (Oboznaja et al. 1981).

Der zytoenzymchemischen Analyse ist bisher nicht die Aufmerksamkeit geschenkt worden, die sie hinsichtlich der Bedeutung und des Wertes, die sie in der gerichtsmedizinischen Praxis haben könnte verdient. In der von uns durchforschten Literatur fanden wir nur die Untersuchungen von Gadshiev et al. 1976, die die Peroxydaseaktivität in Leukozyten untersuchten, auf Grund derer sie Orientierungspunkte über den Zeitpunkt des Eintritts des Todes zu finden hofften. Kömpf et al. 1983 untersuchten die Aktivität der ASD-Esterase in Leukozyten und Lymphozyten des venösen peripheren Blutes in verschiedenen Zeitperioden in Abhängigkeit von ihrer Ausscheidung sowie ihre Aufbewahrungsweise. In ihrer Untersuchung machte Hizhnjakova 1983 nur eine zytomorphologische Analyse aus den entnommenen Abdrücken von der Wundoberfläche in verschiedenen Zeitabständen nach der Verletzung. Es wurde die Leukozytenenzymaktivität in dem eigentlichen Gewebe des Wundgebietes untersucht (Berg und Ebel 1969, 1972; Ojala et al. 1969; Hou-Jensen 1968 u. a.).

Wir haben uns das Ziel gesetzt, die Veränderungen in der Aktivität einiger Enzyme in den segmentkernigen Leukozyten in Abdrücken vor Schnittwunden der Haut zu verfolgen, wobei wir annehmen, in diesen Veränderungen eine Information über den Charakter der Verletzung ob sie zu Lebzeiten entstanden ist, und über ihre Zeitdauer zu erhalten.

Material und Methoden

Bei Meerschweinchen setzten wir nach vorheriger Beschneidung und Rasur des Felles am Rücken nahe des Halses mit einem scharfen Gegenstand Schnittwunden mit einer Länge von 3 cm. Der Schnitt ging durch alle Schichten der Haut und Unterhaut bis auf die Faszien der darunterliegenden Muskelgruppen. In Serien von je 5 Meerschweinchen wurden diese entblutet, und zwar unmittelbar nach der Verletzung, in der 30. und 60. Min und nach der 2., 4., 8., 12., 18. und 24. Std nach der Verletzung. Unmittelbar nach der Tötung, sowie in der 1., 2., 4., 8., 12., 18. und 24. Std nach der Tötung wurden von der Wundoberfläche Abdrücke auf vorher gut gereinigte und leicht angewärmte Deckgläschen entnommen. In gesonderten Serien zu je 5 Meerschweinchen wurden diese durch mechanische Asphyxie (Erdrosseln) getötet und danach in der 10., 30., 60. Minute, in der 1., 2., 4., 8., 12., 18. und 24. Std mit einem scharfen Messer Schnittwunden auf der enthaarten Haut am Rücken gesetzt. Unmittelbar nach der Verletzung wurden ebenso von der Wundfläche Abdrücke auf Deckgläschen entnommen. Die Abdrücke ließen wir bei Zimmertemperatur trocknen und bearbeiteten sie dann mit enzymchemischen Methoden zur Demonstration: – der Alkaliphosphataseaktivität, wobei als Substrat Natriumnaphtholphosphat AS MX und als Distickstoffsalz fast garnet GBC verwendet wird; – der Säurephosphataseaktivität, bei der als Substrat Natrium-alpha-Naphthylphosphat und als Distickstoffsalz fast garnet GBC verwendet wird; – der Enzymaktivität der Adenosintriphosphatase nach der Methode von Padykula und Hermann 1955; der Enzymaktivität der Sukzinatdehydrogenase nach der Methode von Nachlas et al. 1957; der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nach der Methode von Gerebtzoff 1966, 1968. Die Inkubationszeit betrug 90 Min.

Ergebnisse

In den zu Lebzeiten zugefügten Hautwunden von Meerschweinchen wurden in der Zeit vom Nullpunkt bis zur zweiten Stunde keine besonderen Veränderungen in der Enzymaktivität der segmentkernigen Leukozyten in den Abdrücken bei den von uns untersuchten Enzymen beobachtet.

Bei der Untersuchung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in den Abdrücken, die um die vierte Stunde entnommen wurden, wurde nur in einzelnen segmentkernigen Leukozyten in der bereits beträchtlichen Anzahl dieser Zellen eine kaum merkbare Steigerung der Aktivität dieser Enzyme festgestellt, die sich in einigen einzelnen bräunlichschwarzen Granula äußert. In den Abdrücken aus Wunden mit 8stündiger Dauer zu Lebzeiten zeigt sich eine mäßig ausgeprägte Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in fast allen segmentkernigen Leukozyten. Bis zum Schluß der von uns untersuchten Periode von bei Lebzeiten zugefügten Verletzungen blieb das Bild fast unverändert.

In den Abdrücken aus Wunden, die bis zum Ende der ersten 24 Stunden nach Dekapitation der Tiere untersucht wurden, fand sich kein nennenswerter

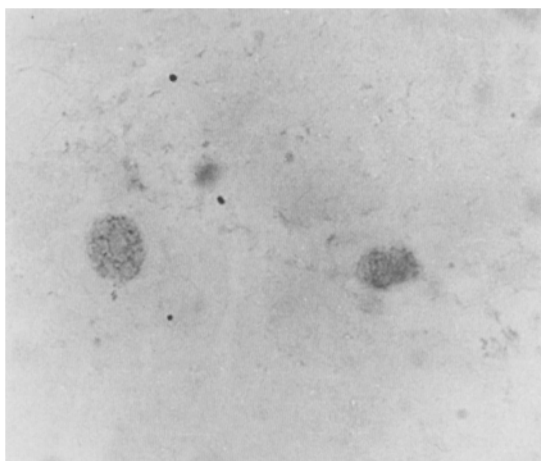


Abb. 1. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die unmittelbar vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Aktivität der sauren Phosphatase, ausgeprägt durch einzelne kleine Granula im Zytoplasma eines segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode mit Naphthylphosphat. Vergrößerung $\times 1280$

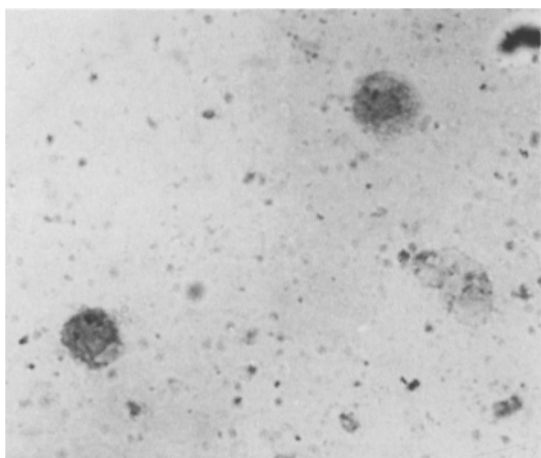


Abb. 2. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die 8 Stunden vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Gesteigerte Aktivität der sauren Phosphatase, ausgedrückt durch Granula und diffuses Dunklerwerden des Zytoplasmas der segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode mit Naphthylphosphat. Vergrößerung $\times 1280$

Unterschied in der Enzymaktivität in den Leukozyten zu der, die im Moment der Dekapitation konstatiert wurde. Dasselbe konstatierten wir auch bei den Untersuchungen der Aktivität der übrigen von uns untersuchten Enzyme in dieser Periode.

In den Abdrücken, die von den Hautverletzungen von den Meerschweinchen entnommen wurden, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tötung der Tiere gesetzt worden waren, fand sich in den selten anzutreffenden Leukozyten eine Aktivität der alkalischen Phosphatase in den ersten 2–4 Std nach dem Tode ähnlich jener, die in den Leukozyten von Wunden zu finden war, die unmittelbar vor der Dekapitation gesetzt worden waren. Zu späteren Zeitpunkten bis zum Ende der 24 Std wurde keine Enzymaktivität mehr festgestellt. Diese Gesetzmäßigkeit zeigte sich auch bei der Untersuchung der Aktivität der übrigen Enzyme.

Abb. 3. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die unmittelbar vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Aktivität der Sukzinatdehydrogenase, ausgeprägt durch einzelne kleine Granula im Zytoplasma eines segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode nach Nachlas et al. (1957). Vergrößerung $\times 1280$

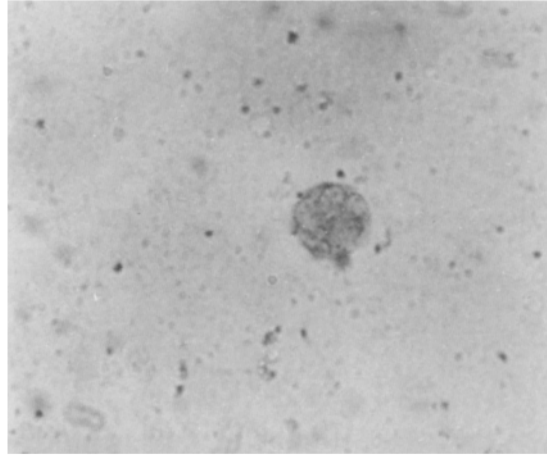
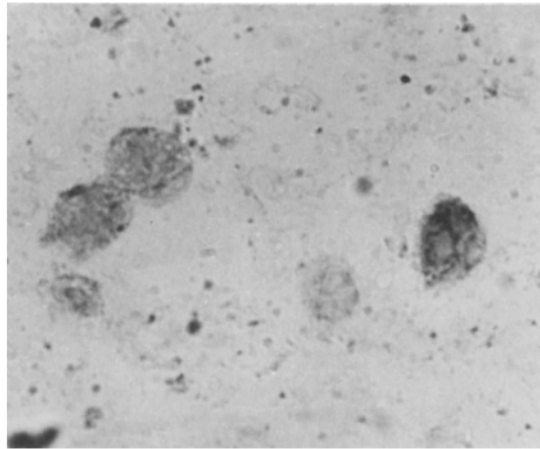


Abb. 4. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die 4 Std vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Gesteigerte Aktivität der Sukzinatdehydrogenase, ausgedrückt durch kleine Granula im Zytoplasma der segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode nach Nachlas et al. (1957). Vergrößerung $\times 1280$



In den Abdrücken von Wunden bei Meerschweinchen mit 4stündiger Dauer zu Lebzeiten fand sich in einem geringen Teil der in beträchtlicher Anzahl erschienenen segmentkernigen Leukozyten eine schwach ausgeprägte Enzymaktivität der sauren Phosphatase, die sich in einzelnen rötlich-braunen Granula darstellte. In den Abdrücken von Wunden bei Meerschweinchen von den übrigen von uns zu Lebzeiten beobachteten Zeitpunkten fand sich eine unbedeutende Steigerung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase, dargestellt durch Zonen von leichteren Verdunklungen im Zytoplasma.

Bei den Untersuchungen von Abdrücken aus den Verletzungen der Meerschweinchen mit verschiedener Zeitdauer zu Lebzeiten konnte in der von uns beobachteten Periode kein Vorhandensein von Zellen mit ausgeprägter Aktivität der Adenosintriphosphatase, die in dem uns interessierenden Gebiet ausgenutzt werden könnte, festgestellt werden. In den segmentkernigen Leukozyten jedoch, die in den Abdrücken der Verletzungen von Meerschwein-

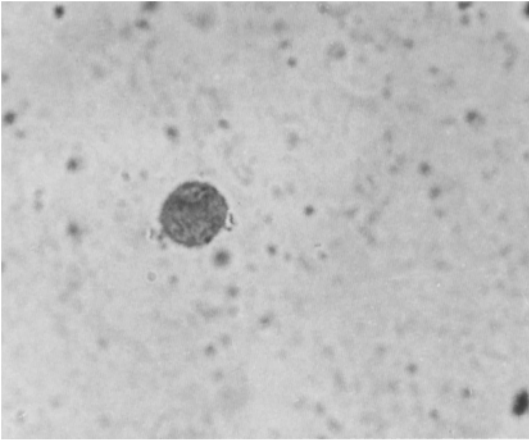


Abb. 5. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die unmittelbar vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, ausgeprägt durch kleine Granula im Zytoplasma eines segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode nach Gereltzoff (1966, 1968). Vergrößerung $\times 1280$

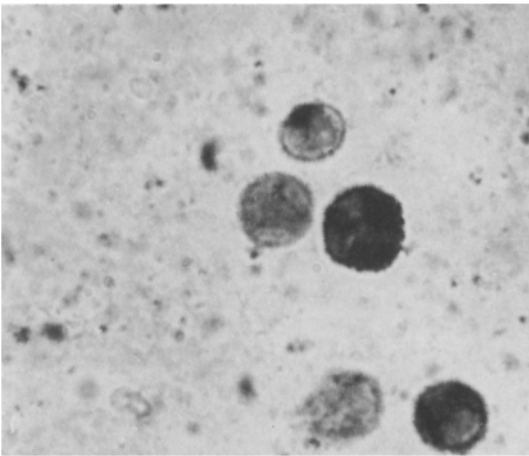


Abb. 6. Abdruck von einer Hautschnittwunde eines Meerschweinchens, die 4 Std vor der Tötung des Tieres zugefügt wurde. Gesteigerte Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, ausgedrückt durch eine Vielzahl grober Granula und diffuses Dunklerwerden des Zytoplasmas der segmentkernigen Leukozyten. Färbemethode nach Gereltzoff (1966, 1968). Vergrößerung $\times 1280$

chen mit 4stündiger Zeitdauer zu Lebzeiten zu finden waren, bemerkten wir eine Enzymaktivität der Sukzinatdehydrogenase, sichtbar durch feine, spärlich über das gesamte Zytoplasma verteilte bläuliche Granula bei diffuser rötlicher Färbung des gesamten Zytoplasmas. Die Aktivität des Enzyms steigert sich merklich in den obengenannten Zellen in jenen Abdrücken, die den Wunden mit 8stündiger Dauer zu Lebzeiten entnommen worden waren.

Genau dieselbe – bezüglich ihrer Gesetzmäßigkeit und Zellverteilung – ist die von uns beobachtete Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in den Abdrücken aus den Hautwunden der Meerschweinchens in der von uns untersuchten Periode. Zu beobachten ist eine merkliche Steigerung der Aktivität der beiden Enzyme in den Zellen aus den Wundabdrücken der Meerschweinchens mit 4stündiger Dauer zu Lebzeiten. Diese Aktivität drückt sich durch diffus über das gesamte Zytoplasma verstreute bräunliche Granula bei den meisten der angetroffenen segmentkernigen Leukozyten in den Wundabdrücken aus.

Diskussion

Die zytochemische Analyse zeigt eine merkliche Aktivitätssteigerung der untersuchten Enzyme um die 4. Std nach der Hautverletzung. Diese Steigerung der Enzymaktivität wird der eingetretenen Umwandlung des normal verlaufenden Stoffwechselprozesses in den Leukozyten, hervorgerufen durch die Einwirkung eines schädigenden Agents – der Verletzung der Haut – zugrundegelegt. In den ersten Stunden nach der Verletzung wandelt die zugefügte Schädigung schnell den normal verlaufenden metabolischen Prozeß in den Zellen, einschließlich der Leukozyten, um und ruft eine Art von metabolischer „Explosion“ mit plötzlicher Steigerung aller Prozesse – der abbauenden und der synthetisierenden – in ihrem Metabolismus hervor. Am demonstrativsten ist die Zunahme der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase um die 4. Std nach Verletzung der Haut. In der Entwicklung der komplizierten Stoffwechselprozesse, die durch mechanische Schädigung der Haut hervorgerufen werden, sind auch verstärkte Hydrolyseerscheinungen zu bemerken – Anzeichen dafür ist die zu beobachtende erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase und der sauren Phosphatase. Eine ähnliche Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatase beobachteten Raekallio 1961, Wachstein 1946, aber in den segmentkernigen Leukozyten im Wundgewebe selbst. Wiederum fand Raekallio 1961, 1965 in diesen Leukozyten in der gleichen Lage im Gewebe ähnlich wie wir eine Steigerung der Aktivität der Sukzinatdehydrogenase um die 4.–8. Std nach der Verletzung der Haut.

Auf Grund der Veränderungen in der Aktivität der untersuchten Enzyme kann man auf die sich entwickelnden Veränderungen in der Zelle selbst Rückschlüsse ziehen. Die Entwicklung und der Grad dieser Veränderungen stehen in enger Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit vom Moment der zugefügten Schädigung bis zum Moment der durchgeführten Beobachtung der entsprechenden Enzymaktivität. So können in der Dynamik der Veränderungen der Aktivität der untersuchten Enzyme biochemisch bedingte Anzeichen als Merkmale gefunden werden – sowohl dafür, daß die Verletzung der Haut zu Lebzeiten geschah, als auch für die Zeit, die seitdem verstrichen ist.

Aus dem bisher ausgeführten geht hervor, daß die Untersuchung einzelner Zellen und konkret der segmentkernigen Leukozyten in den Abdrücken aus Hautwunden hauptsächlich wegen ihrer Gewebsunabhängigkeit und Bewahrung der Zellganzheit durch zytochemische Analysemethoden genauere, differenzierte Möglichkeiten zur Beurteilung liefert, ob die Hautverletzung zu Lebzeiten geschah und wie lange sie schon besteht, als die traditionellen histomorphologischen Untersuchungsmethoden.

Literatur

- Berg S (1972) Die Altersbestimmung von Hautverletzung. *Z Rechtsmed* 70: 121–135
Berg S, Ebel R (1969) Altersbestimmung subkutaner Blutungen. *Münch Med Wochenschr* 1185–1190

- Gadzhiev A, Kadiev B, Silin E (1976) Influence on peripheral leukocyte peroxidase activity of the time interval after death. In: Smol'yaninov WM (ed) First Allunion Congress on Forensic Medicine. Department of Health, Moscow, pp 233–234 (Russ)
- Gerebtzoff M (1968) Contribution histochimique à l'étude de la lactate déhydrogénase et ses iso-enzymes. *Pathol Biol Paris* 16:601–609
- Gerebtzoff M (1966) Détection histochimique d'isoenzymes de la LDH dans le nerf et le ganglion spinal. *C R Soc Biol (Paris)* 160:1323–1325
- Hizhnjakova K (1983) Dynamics of craniocerebral injury pathomorphology. *Medizina, Moscow*, pp 19–25 (Russ)
- Hou-Jensen K (1968) Histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes as vital reaction in medicolegal practice. *J Forensic Med* 15:91–105
- Kömpf J, Oehmichen M, Smidt V (1983) Enzymaktivität isolierten Leukozytenpopulationen. *Z Rechtsmed* 90:115–125
- Oboznaja E, Pushkar N, Markova O, Pankov E (1981) Frozencell cytochemistry. *Naukova dumka, Kiev*, pp 7–16 (Russ)
- Ojala K, Lempinen M, Hirvonen J (1969) A comparative study of the character and rapidity of the vital reaction in the incised wounds of human skin and subcutaneous tissue. *J Forensic Med* 16:29–34
- Nachlas M, Tsou K, De Souza E, Cheng C, Seligman A (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 3:420
- Padykula H, Herman E (1955) Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 3:161
- Padykula H, Herman E (1955) The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 3:170
- Raekallio J (1961) Histochemical studies on vital and post-mortem skin wounds. University of Helsinki, Helsinki, pp 7–11
- Raekallio J (1965) Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzym-histochemischen Methoden. Max Schmidt-Römhild, Lübeck, S 11–16
- Wachstein M (1946) Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J Lab Clin Med* 31:1–17

Eingegangen am 7. Oktober 1987