

Beitrag zur Erklärung unspezifischer serologischer Reaktionen in fauligem Knochengewebe

R. Hauser¹ und B. Brinkmann²

¹Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Akademie Gdąnsk, Curie Skodowskiej 3a, PL-80-210 Gdąnsk, Polen

²Institut für Rechtsmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Von-Esmarch-Strasse 86, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen 20. Oktober 1989

A contribution to the explanation of unspecific serological reactions in putrid bone tissues

Summary. Bone fragments were stored in water for 2 years at room temperature and investigated serologically using the following methods: Absorption-elution, extraction of blood group substances and immunohistochemistry (PAP). All 3 methods gave essentially specific results for fresh bone tissue but with putrid bone tissue unspecific reactions were found predominantly with the absorption-elution and PAP techniques. In contrast, more specific reactions were obtained from the extracts although they were much weaker. From this it can be concluded that pure physical binding plays a substantial role in the unspecific reaction between antibodies and bone material. It is suggested that the relevant physical properties are altered by putrifaction.

Key words: ABO in bones – Putrifaction – Extraction – Immunohistochemistry

Zusammenfassung. Knochenteile wurden in Wasser bei Raumtemperatur 2 Jahre aufbewahrt und anschließend serologischen Untersuchungen unterzogen. Zur Anwendung kamen folgende Untersuchungsmethoden: Absorptions-Elutionstest, Extraktion von Blutgruppensubstanzen, Immunhistochemie (PAP). In frischen Knochen ergaben alle 3 Methoden im wesentlichen spezifische Ergebnisse. In faulen Knochenproben zeigten das Absorptions-Elutions- und das PAP-Verfahren unspezifische Reaktionen. Die Re-

aktionen in den Extrakten waren dagegen eher spezifisch, jedoch extrem schwach. Daraus wird der Schluß gezogen, daß bei der Entstehung unspezifischer Reaktionen in faulem Knochengewebe rein physikalische Bindungen von Antikörpern mit dem durch Fäulnis veränderten Knochenmaterial eine wesentliche Rolle spielen.

Schlüsselwörter: ABO an Knochen – Fäulnis – Extraktion – Immunhistochemie

Einleitung

Das Problem der Blutgruppenzugehörigkeit von postmortal verändertem Material – meist handelt es sich um Knochengewebe – wurde bis heute nicht endgültig geklärt. Das Postulat, daß es keine Möglichkeit gibt, Blutgruppeneigenschaften, die während des Fäulnisprozesses erworben wurden, von ursprünglich vorhandenen zu unterscheiden (Jenkins et al. 1972) [12] wurde durch Untersuchungen an faulem Knochengewebe in Frage gestellt (Hauser 1986) [10]. – Übereinstimmend wird zu dieser Thematik angenommen, daß die serologischen Untersuchungen an fäulnisverändertem Leichenmaterial mit Fehlern behaftet sind (Allison et al. 1979; Berg et al. 1983; Berg und Henkel 1987; Bertozzi-Süßmann et al. 1985; Cameron et al. 1959; Ezra-Dohn und Cook 1961; Hauser et al. 1984; Thieme et al. 1956; Thieme und Otten 1957). Dies hat seine Ursachen sowohl im Verlust serologischer Eigenschaften als auch darin, daß neue antigene Eigenschaften erworben werden können (Berg et al. 1983; Cameron et al. 1959; Pereira 1973; Seyfriedowa 1961). Bakterien sind hierbei auf zweierlei Weise wirksam: durch ihre enzymatische Aktivität (Cameron et al. 1959; Pereira 1973) und durch ihre eigenen, antigenen Eigenschaften (Hauser et al. 1984; Springer et al. 1961; Springer 1970). Darüber hinaus existieren Hinweise auf den Einfluß von Pilzen, Insektenlarven und Pflanzensaprophyten bei der Veränderung der Blutgruppenaktivität. Yamamoto et al. (1985) erklären den Einfluß durch Pilze damit, daß ihre chemische Zusammensetzung den antigenen Strukturen des ABO-Systems ähnlich sei. Bei Knochenmaterial weisen Kramer et al. (1962), Kellermann (1971), Thieme et al. (1956) sowie Thieme und Otten (1957) auf die Bedeutung nicht-spezifischer serologischer Reaktionen hin. Mukoyama und Seta (1986) sind der Ansicht, daß falsch positive serologische Reaktionen an kompakten Knochen Folge eines (unspezifischen) Eindringens von Antikörpern sind. Bereits früher war darauf hingewiesen worden, daß dies die Hauptursache falscher serologischer Reaktionen sein könnte (Hauser 1985). Diesen letzteren Annahmen und Hypothesen sollte durch die vorliegende Untersuchung nachgegangen werden.

Material und Methoden

Proximale Femurteile von Leichen mit den Blutgruppen A₁, A₂, B und O wurden zunächst mechanisch wie folgt bearbeitet: Heraustrennung von 1 mm dicken Scheiben, Zerkleinerung des restlichen Materials in 0,3–0,5 mm große Partikel. Eine Hälfte des Materials wurde in frischem Zustand untersucht, die andere wurde mit Wasser überschichtet 2 Jahre bei Raumtemperatur einem Fäulnisprozeß ausgesetzt (das Gefäß war mit einer Folie abgedeckt).

Folgende Untersuchungsmethoden kamen zur Anwendung:

(1) Absorptions-Elutionsmethode:

Untersucht wurden jeweils 20 mg bzw. 50 mg des zerkleinerten Materials. Seren: Polyklonales Anti-A und Anti-B. Anti-H: UEA-Lektin.

(2) Extraktion von Blutgruppensubstanzen – Einzelheiten s. Hauser (1986):

- Spülung des Knochenpulvers in destilliertem Wasser und Azeton;
- Entkalkung in EDTA;
- Erneute Spülung in destilliertem Wasser und Azeton;
- Extraktion in Phosphatpuffer-N-Butanol;
- Extraktion aus der Butanolphase durch Chloroform/Methanol/Wasser;
- Einengung der Extrakte;
- Untersuchung der Extrakte auf Blutgruppensubstanzen mit Hilfe der AE-Methode. Seren wie unter (1).

(3) Immunhistochemie mittels PAP (Hauser et al. 1989)

- Fixierung der Fragmente in Formalin;
- Entkalkung in EDTA;
- Entfernung endogener Peroxidasen durch H₂O₂ in Methanol;
- Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch Schweineserum;
- Absorption mit folgenden Seren: Monoklonales Anti-A und Anti-B, Biotest, Verdünnung 1:10, Lektin UEA 1 (Medac), Verdünnung 1:800; weitere Antikörper: Kaninchen-Anti-Maus bzw. Kaninchen-Anti-UEA, Verdünnung 1:500 bzw. 1:100, Anti-Kaninchen vom Schwein (Dakopatts) 1:100, PAP (Dakopatts) 1:100;
- Farbreaktion: H₂O₂ und 3-Amino-9-Ethylcarbazol, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Ergebnisse

In den frischen Knochen zeigten alle 3 Methoden im wesentlichen spezifische Ergebnisse (Tabellen 1a, 2a, 3a). Histochemisch ergaben die Endothelzellen, Erythrozyten und das Osseomukoid stark positive Reaktionen, während das Bindegewebe der Haverschen Kanäle nur schwach positiv reagierte (Tabelle 3a). Allerdings zeigte das Osseomukoid zweier Personen der Blutgruppe A eine schwach positive Reaktion mit Anti-B, während in diesen Fällen die übrigen Strukturen spezifisch reagierten (Tabelle 3a). – Die AE-Technik an fragmentierten Knochen ergab jeweils eindeutige und spezifische Ergebnisse (Tabelle 1a). Am Knochenextrakt waren eindeutige Ergebnisse nur mit der höheren Extraktionsmenge von 40 µl zu erzielen (Tabelle 2a).

Tabelle 1. Serologische Aktivität der Knochenpartikel in der Absorptions-Elutionstechnik. a) Reaktionen im frischen Knochen; b) Reaktionen nach 2-jähriger in-vitro-Fäulnis. Einteilung der Agglutinationsstärken von – bis +++

	a)						b)					
	20 mg			50 mg			20 mg			50 mg		
	α	β	UEA	α	β	UEA	α	β	UEA	α	β	UEA
1. A ₁	++	–	–	++	–	–	+	+	±	++	+	+
2. A ₂	++	–	–	++	–	–	+	+	±	+	+	+
3. A ₁	++	–	–	+++	–	–	++	+	±	++	++	+
4. 0	–	–	+	–	–	+	+	+	±	±	++	+
5. B	–	++	–	–	+++	–	+	++	±	++	++	+

Tabelle 2. Serologische Aktivität der Knochenextrakte in der AE-Technik. a) Reaktionen im frischen Knochen; b) Reaktionen nach 2-jähriger in-vitro-Fäulnis. Einteilung der Agglutinationsstärken von – bis +++

	a)						b)					
	10 µl			40 µl			10 µl			40 µl		
	α	β	UEA	α	β	UEA	α	β	UEA	α	β	UEA
1. A ₁	+	–	–	+	–	–	±	–	–	–	–	–
2. A ₂	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
3. A ₁	+	–	–	++	–	–	±	–	–	–	–	–
4. 0	–	–	±	–	–	+	–	–	–	–	–	–
5. B	–	+	–	–	++	–	±	–	–	±	+	–

Tabelle 3. Serologische Aktivität im immunhistochemischen Bild (PAP-Technik). a) Reaktionen im frischen Knochen; b) Reaktionen nach 2-jähriger in-vitro-Fäulnis. Einteilung der Färbintensität von – bis +++

	a)			b)		
	α	β	UEA	α	β	UEA
1. A ₁	++	±*	±	±	±	±
2. A ₂	++	±*	+	±	±	±
3. A ₁	+++	–	+	+	–	++
4. 0	–	–	+	++	++	++
5. B	–	++	+	–	±	+

* Die beiden so gekennzeichneten ±-Reaktionen betreffen lediglich eine schwache Mitreaktion des Osseomucoids, nicht der anderen Strukturen (s. Text). Alle übrigen ±-Reaktionen sind homogen und deuten eine ausgesprochen schwache Reaktion an (grenzwertig)

Nach 2-jähriger in-vitro-Fäulnis waren die Ergebnisse heterogen und unsicher: Der Knochenextrakt reagierte entweder abgeschwächt oder nicht ganz eindeutig, das Reaktionsbild war durch die Steigerung der Menge nicht wesentlich beeinflussbar (Tabelle 2b). Dennoch war im Vergleich mit den beiden anderen Methoden hier das Reaktionsmuster noch am ehesten spezifisch. – Das Reaktionsbild in der AE-Technik am zerkleinerten Knochenmaterial war ubiquitär unspezifisch positiv; gleiches gilt für das Reaktionsmuster in der Immunhistochemie (s. Tabellen 1b, 3b).

Diskussion

Das hier verwendete Modell der in-vitro-Fäulnis in Wasser bei Raumtemperatur kann nicht als repräsentativ für sämtliche Fäulnisbedingungen gelten, schon gar nicht für solche unter Einbeziehung von Erd- und Luft-Lagerung (Berg 1975). Bezogen auf die Fragestellung des ABH-Nachweises unter Fäulnisbedingungen kann es jedoch durchaus modellhaften Charakter haben. Es hat im Hinblick auf Übertragbarkeit auf praktische Verhältnisse jedenfalls den Vorteil einer großen

Homogenität der Exposition bei unterschiedlicher Blutgruppenprägung. Systematische Einflüsse lassen sich bei prinzipiell ungleichen Nachweistechniken im Methode/Methode-Vergleich besser erkennen.

Die Überprüfung des frischen Materials führte zu Ergebnissen entsprechend der Erwartung. – Die immunhistochemisch beobachtete ubiquitäre Positivität von H steht keinesfalls im Widerspruch zum genetischen Modell. Die Unterschiede der H-Reaktionsstärke im Vergleich der Methoden (Tabelle 1a/2a zu 3a) kann sehr wohl durch die Sensitivität der Immunhistochemie bedingt sein. – Die immunhistochemisch (schwache) B-Reaktionsausfall im A-Gewebe (Osseomukoid) war auch durch Antikörperverdünnungen nicht zu supprimieren. Am Fehlen einer entsprechenden Mitreaktion der Endothelzellen und der Erythrozyten war sie als Fehlreaktion ohne weiteres erkennbar. Wegen dieser topologischen Komponente muß man daher an eine echte „Kreuzreaktion“ denken, speziell mit den Aminosucker-reichen Mukopolysacchariden.

Die heterogenen Reaktionsmuster im faulen Knochen lassen an unterschiedliche Einflüsse denken: Zunächst fällt im Methodenvergleich auf, daß die Extrakte (Tabelle 2b) am schwächsten, gleichzeitig jedoch am „spezifischsten“ reagierten. Dies läßt einerseits den Schluß zu, daß mit dem – hocheffizienten – Extraktionsverfahren nur wenig ABH-Substanz zu gewinnen war, also nur wenig ABH-Substanz vorlag. Da die Wirkung bakterieller Glycosidasen und Deacetylasen im faulen Gewebe nach der Literatur feststeht (Cameron et al. 1959; Pedal 1987; Pereira 1973), ist ihr Einfluß im Hinblick auf Bildung neuer Antigene offensichtlich gering. Die bei uns verwendete Butanolextraktion kann zu dieser geringen Ausbeute nicht beigetragen haben; denn auch die bakteriellen Lipopolysaccharide sind in Butanol löslich. In gleichem Sinn lassen sich die Ergebnisse von Springer et al. (1961) und Springer (1970) interpretieren: Erst bei Bakterienkonzentrationen über 10 mg% lassen sich hohe Antigenkonzentrationen feststellen. – Im Vergleich hierzu reagierten die beiden anderen Methoden unspezifischer und stärker. Dieser Befund muß an nichtspezifische Reaktionen *im Knochen* denken lassen. Bedenkt man ferner, daß die organische Matrix kaum noch zur Wirkung kommen kann – sie ist nach dem 2-jährigen Zersetzungsprozeß weitgehend zerstört –, so muß man auch an physikalische Veränderungen im anorganischen Gerüst denken: Durch den Verlust der organischen Matrix entstehen im Knochen zahlreiche Kanälchen, Poren, Mikrorisse, Mikrolakunen; in dieses Gerüst dringen die Antikörper zwar ein, lassen sich jedoch bei der Waschprozedur nur unvollständig entfernen. Diese Strukturen dürften daher die wesentliche Ursache der entstehenden unspezifischen Reaktionen sein. – Die offensichtliche Verstärkung der UEA-Reaktion (Tabellen 1b, 3b) läßt zwei Deutungen zu: Entweder stärkere „Adsorption“ dieses Antikörpers an die vorstehend beschriebenen Strukturen oder Entstehung von vermehrtem H-Antigen durch die vorhergehende Abspaltung von A- und B-determinierenden Zuckern.

Die bereits vor geraumer Zeit geäußerte Vermutung für die Ursache der unspezifischen Knochenreaktionen (Hauser 1985; Mukoyama und Seta 1986) findet somit durch diese Untersuchung eine Bestätigung. Hierzu paßt auch die Beobachtung von Berg et al. (1983), daß die unspezifischen Reaktionen in auffälliger Parallelität zu den mikroskopischen Veränderungen am faulenden Knochen auftreten.

Insgesamt ist jedoch festzustellen, daß die in faulen Knochen zu beobachtenden unspezifischen ABH-Reaktionen unterschiedliche und daher schwer syste-

matisierbare Ursachen haben dürften. Eine für forensische Zwecke erkennbare Gesetzmäßigkeit haben unsere Untersuchungen jedenfalls nicht aufgezeigt.

Literatur

1. Allison M, Hossaini AA, Castro N, Munizaga J, Pezzia A (1979) ABO blood groups in Peruvian mummies. *Am J Phys Anthropol* 49: 139–142
2. Berg S, Bertozzi B, Meier R, Mendritzki S (1983) Vergleichend-methodologischer Beitrag und kritische Bemerkungen zur Interpretation von Blutgruppenbestimmungen an Mumienrelikten und Skelettfunden. *Anthropol Anz* 41: 1–19
3. Berg S, Henkel N (1987) Dimostrazione immunostologica di sostanze gruppospecifiche in tessuti cadaverici, ossa e capelli umani. *Zacchia* 4: 81–91
4. Berg S (1975) Leichenzerstörung und Leichenzerstörung. In: Mueller B (ed) *Gerichtliche Medizin*, Bd 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 62–106
5. Bertozzi-Süßmann B, Berg S, Ansorg R (1985) Einflüsse der Leichenfauna und mikrobiellen Saprophytie auf Blutgruppenbefunde an menschlichen Geweben. *Z Rechtsmed* 94: 227–235
6. Cameron C, Graham F, Dunsford I, Sickles G, Macpherson CR, Cahan A, Sanger R, Race RR (1959) Acquisition of AB-like antigen by red blood cells. *Br Med J* 2: 29–32
7. Ezra-Cohn HE, Cook SF (1961) Blood typing compact human bone tissue. *Nature* 191: 1267–1268
8. Hauser R, Raszeja S, Pawlowski R, Samet A (1984) Mikrobielle Kontamination der Antigene ABO im Knochengewebe. *Z Rechtsmed* 92: 189–197
9. Hauser R (1985) Essai d'explication du mécanisme d'apparition des réactions non-spécifiques dans os soumis à la putrefaction. XIII^e Congrès de l'Académie Internationale de Médecine Légale et de Médecine Sociale. Budapest 16–20 September 1985
10. Hauser R (1986) Der Versuch einer Einschätzung der Blutgruppenzugehörigkeit von Knochen, die dem Verwesungsprozeß unterliegen. *Z Rechtsmed* 96: 49–55
11. Hauser R, Rand S, Annuß B, Brinkmann B (1989) Immunchemische und chromatographische Bestimmung von ABH-Antigenen im kompakten Knochengewebe. *Z Rechtsmed* 102: 399–408
12. Jenkins GC, Brown J, Lincoln P, Dodd BE (1972) The problem of the acquired B antigen in forensic serology. *J Forensic Sci Soc* 12: 597–603
13. Kellermann G (1971) Methodological investigations on the ABO-typing of ancient bones. *Humangenetik* 14: 50–55
14. Kramer K, Sondermeier D, Flatow H (1962) Untersuchungen zur mehrfach behaupteten Nachweisbarkeit der ABO-Gruppensubstanz in menschlichen Zähnen. *Z Ärztl Fortbild* 56: 750
15. Mukoyama H, Seta S (1986) The determination of blood groups in tissue samples. *Forensic Science Progress*, Bd 1. Springer, Berlin Heidelberg New York
16. Pedal I (1987) Blutgruppen-Immunhistochemie. ABO(H)- und Lewis-Antigene menschlicher Gewebe. Thieme, Stuttgart
17. Pereira M (1973) ABO grouping of decomposed human tissue. *J Forensic Sci Soc* 13: 33–36
18. Seyfriedowa H (1961) Czynniki i jego znaczenie w serohematologii sadowej. *Praca habilitacyjna*, Poznań
19. Springer G, Williamson P, Brandes WC (1961) Blood group activity of gramnegative bacteria. *J Exp Med* 113: 1077–1093
20. Springer G (1970) Importance of blood-group substances interactions between man and microbes. *Ann N Y Acad Sci* 169: 134–152
21. Thieme FP, Otten CM, Sutton HE (1956) A blood typing of human skull fragments from the pleistocene. *Am J Phys Anthropol* 14: 437–443
22. Thieme FP, Otten CM (1957) The unreliability of blood typing aged bone. *Am J Phys Anthropol* 15: 387–397
23. Yamamoto A, Yamaguchi YF, Davé V (1985) Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination. *Blood* 54: 344–350