

Enzymdarstellung am fixierten Organgewebe

E.Tutsch-Bauer, E.Josephi, J.Teifel-Greding

Prof.Dr.W.Spann, Institut für Rechtsmedizin der Universität München, Frauenlobstr.7a, 8000 München 2

SUMMARY

The successful determination of GLO subtypes (starch gel electrophoresis) and PGM subtypes (isoelectrofocusing) in tissues, skeletal musculature and liver, applying ethanol and acetone fixation is reported.

Other fixing agents such as formalin, buffered formalin pH 7,5 and glutaraldehyde are destroying any enzyme activity of the considered systems EsD, GLO, GPT, SEP, PGM.

Applying ethanol and acetone fixation no results could be obtained in EsD and SEP system.

Differing results showed GPT, the intensity of the spots varied extremely even under stable experimental conditions.

GLO and PGM subtyping using ethanol was successful within a period of four weeks. PGM subtypes using acetone fixation could be demonstrated even after a storage time of two months.

EINLEITUNG

Die Anforderungen der Strafverfolgungsbehörde an die Aussagekraft eines serologischen Spurengutachtens sind hoch, wobei der Gutachter nicht selten vor dem Problem steht, daß aufgrund ausgedehnter Verletzungen oder fortgeschrittener Fäulnis bei der Obduktion von Getöteten kein Blut zur Blutgruppenbestimmung gewonnen werden kann, somit eine Zuordnung von Spuren nicht möglich erscheint. Über den Nachweis von Blutgruppensubstanzen an Sekreten und Körpergeweben existieren zahlreiche Arbeiten, wobei die Untersuchungen am Gewebe überwiegend entweder am frisch entnommenen Material oder an Gefrierschnitten durchgeführt wurden (Hoste, e.a., Oepen, Oya, e.a., Stöhlmacher, e.a., Tutsch-Bauer, e.a.). In der umfangreichen Darstellung "Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe" wurde von Oepen vermerkt, daß über Muskulatur relativ wenig berichtet wurde, obwohl sie neben guter Resistenz gegenüber autolytischen Prozessen vor allem auch von Extremitäten gewonnen werden kann. Bei Leichenzerstückelung oder Massenkatastrophen kann somit durch Bestimmung von Blutgruppen- und Enzymsystemen am Muskel eine Zuordnung von Leichenteilen bzw. eine Identifizierung erfolgen. Von Oepen wurde weiter ausgeführt, daß die Untersuchung bereits fixierter Organe, die offenbar erfolgreich sein kann, in der Praxis kaum Anwendung findet.

Da, wie angeführt, ein Enzymnachweis am frischen Gewebe oder Gefrierschnitt nur über kurze Zeit möglich ist, sollte, um zumindest eingeschränkt zeitunabhängig arbeiten zu können, eine Fixationslösung gefunden werden, wodurch die Enzymaktivität serologisch interessanter Enzymsysteme (EsD, GLO, GPT, SEP, PGM) nicht zerstört wird.

Zahlreiche Untersuchungen sind im Rahmen der Histochemie auf die Ermittlung der nach Fixation verbleibenden Aktivität verschiedener Enzyme gerichtet worden, wobei Ziel der Fixation sein sollte, die Enzyme unlöslich zu machen, ohne die Aktivität merklich zu beeinflussen. Auch muß das Enzym nach der Fixation außer der Aktivität noch seine Spezifität besitzen. Empfohlen wird zur Fixation Aceton p.a. sowie Aethanol, da diese Reagenzien vom chemischen Gesichtspunkt wenig aggressiv erscheinen. Formalin und Glutaraldehyd sollen bei einigen Enzymen, u.a. der sauren Phosphatase, dem Aceton und Aethanol überlegen sein.

MATERIAL UND METHODE

Anlässlich gerichtlicher Obduktionen wurden Gewebsblöcke, 2x 1 cm, aus m. psoas und Leber entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Leiche keine offensichtlichen Fäulniserscheinungen aufwies, ferner wurde eine Kontrollblutprobe asserviert. Als Fixationslösungen wurden Formalin 4 %, mit NaOH gepuffertes Formalin pH 7,5, Glutaraldehyd 6,5 % (Sacharoselösung 0,2 M), Aethanol absolut und Aceton p.a. verwandt. Von den fixierten Gewebsblöcken wurden mit dem Skalpell kleinste Teile (5 mg) abgeschnitten und auf einer Glasplatte mit einem Reagenzröhrchen zu dünnen Plättchen ausgerollt. Durch Verdunstung entstanden harte Plättchen, die auf die Größe der üblicherweise verwendeten Filterpapiere zugeschnitten wurden und danach direkt auf das Gel aufgelegt bzw. in das Gel verimpft wurden. Folgende Enzymsysteme wurden in die Untersuchung mit einbezogen: EsD (Agarose-Gel-Elektrophorese), GLO, EsD, SEP (Stärke-Gel-Elektrophorese), PGM (Stärke-Gel-Elektrophorese und Isoelektrofokussierung).

ERGEBNISSE

Die in Formalin 4%, gepuffertem Formalin und Glutaraldehyd fixierten Gewebeproben erbrachten in keinem der angeführten Systeme ein Ergebnis, die Enzymaktivität war offensichtlich rasch zerstört worden.

Die saure Erythrozyten-Phosphatase und Esterase-D waren am Muskel und der Leber nach Fixation nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse im GPT-System am aceton- und alkoholfixierten Muskel waren bei gleichbleibenden Untersuchungsbedingungen stark schwankend, teils zeigten sich überfärbte, teils zu schwache Banden. Die Leberproben ergaben hier durchgehende Schlieren, keine abgrenzbaren Spots, so daß eine Typisierung nicht erfolgen konnte.

Alkohol- und acetonfixierte Gewebsproben erbrachten gleichmäßige, gut ablesbare Zymogramme im GLO- und PGM-System. Ein Waschen der Gewebsproben nach Fixierung, vor Probenentnahme, führte zu einer Abschwächung der Banden im PGM-System in der Stärkegelelektrophorese, besonders im Bereich der 2er-Spots. Nach längerer Lagerungszeit der Gewebsproben in Alkohol zeigte sich eine deutliche Abschwächung der Ergebnisse, so daß das Aceton für die vorliegenden Untersuchungen als ideales Fixationsmittel anzusehen ist.

GLO- und mit Einschränkungen GPT-Muster der Gewebe entsprechen dem Bild der Erythrozyten-Hämolyse, daß jedoch die PGM-Muster vom Gewebe etwas anders ausfallen als die der Erythrozyten-Hämolyse war nach den Erfahrungen von Oepen am unfixierten Muskel in der Stärke-Gel-Elektrophorese zu erwarten. Im wesentlichen zeigte sich in vorliegender Untersuchung ein abweichendes Bild im Bereich der b- bzw. c-Bande. Ähnlich wie von Berg e.a. an gelagerten Blutproben und Blutspuren beschrieben, zeigte sich ein anodales Auswandern der c-Bande.

Bei zunehmender Abschwächung der Banden konnten GLO und GPT bis zu einem Zeitraum von 4 Wochen typisiert werden, das PGM-System ergab nach einer Lagerungszeit von 2 Monaten noch gut ablesbare Ergebnisse.

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei traumatisierten, ausgebluteten Leichen mit der aceton- und aethanolfixierten Skelettmuskulatur Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, woran sich serologisch interessante Systeme auch nach längerer Lagerungszeit mit der im Strafprozeß erforderlichen Sicherheit nachweisen lassen.

LITERATUR

- Hoste B, Brocteur J, Andre A (1977) Choice of the most suitable tissues for blood grouping of cadavers. Ref Bd 7, Int Tagg Gs forens Blutgruppenkd, Hamburg S 349-357
- 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
- Oepen J (1977) zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe. In: Fortschritte der Hämatologie JA Barth Leipzig Bd 4 S 309-350
- Oya M, Kido A, Komatsu N, Shibata R (1984) Die Anwendung der Histoelktrofokussierung zur Bestimmung der PGM₁-Subtypen an menschlichen Körpergeweben. 92:225-230
- Stöhlmacher P, Haferland W (1981) Histoelktrophorese zur Typisierung von Enzymsystemen menschlicher Körpergewebe. Z.Rechtsmed 87: 249-252
- Tutsch-Bauer E, Oya M, Tröger H.D (1981) PGM₁-Fokussierung in frischen menschlichen Körpergeweben und nach Lagerung. Ref Bd 9 Int Tagg Ges forens Blutgruppenkd, Bern S 155-160

VI. Population Genetics

