

Aus dem Institut für Gerichtsmedizin und Versicherungswesen der Universität Neapel (Direktor: Prof. Dr. V. M. PALMIERI)

Das Choleglobin als grünes Leichen-Hämopigment

Von

V. M. PALMIERI und CARLO ROMANO

(Eingegangen am 5. Oktober 1956)

Die Natur der grünen Leichen-Hämopigmente ist nicht sehr bekannt, es erscheint uns deshalb angebracht, dieses Problem auf Grund der neueren Erkenntnisse über die verschiedenen grünen Derivate der Hämoglobine: Choleglobin, Sulfhämoglobin, Pseudohämoglobin, Cruor-albin, Verdohämochromogen zu klären. Aus dieser Serie sind jedoch nur das Choleglobin, das ein physiologisches Zwischenprodukt bei der Umwandlung des Hämoglobins in biliäre Pigmente ist, und das Sulfhämoglobin, das gewöhnlich als das grüne Leichenpigment angesehen wird, in Betracht gezogen worden.

Versuche

Wir gingen wie folgt vor:

- a) Hemisynthese einiger grünen Pigmente aus pulverisiertem Hämoglobin B. D. H. und Bestimmung ihrer elektrophoretischen Eigenschaften;
- b) Herstellung von Extrakten aus grünen Leichenorganen und Bestimmung ihrer elektrophoretischen Eigenschaften.

A. Bestimmung des Sulfhämoglobins und des Choleglobins

a) *Sulfhämoglobin*. Durch eine 1%ige wäßrige Hämoglobinlösung leitet man 12 Std lang Schwefelwasserstoff und Luft; die erhaltene Flüssigkeit ist von intensiver Grünfärbung, hat einen starken Geruch nach Schwefelwasserstoff und zeigt keine Benzidin-Reaktion. Um einen Überschuß von H_2S zu vermeiden, läßt man die Luft noch 48 Std lang perlen und zieht das restliche Gas mittels Rotationspumpe im Vakuum ab. Die erhaltene Flüssigkeit hat den Schwefelwasserstoffgeruch verloren, reagiert auf Benzidin und weist spektroskopisch die charakteristischen Streifen bei $\mu\mu$ 617—623 auf.

b) *Choleglobin*. Zu 30 ml einer 1,2%igen wäßrigen Hämoglobinlösung fügt man 20 ml Phosphatpuffer p_H 6,6 nach SOERENSEN und CLARK und 50 mg kristallisierte Ascorbinsäure hinzu. Darauf bringt man die Lösung in ein Wasserbad von $37^\circ C$ unter vorheriger Zufügung von einem Tropfen H_2O_2 . Nach 4—5stündiger Inkubationszeit bildet sich ein intensiv grünes Präzipitat. Man zentrifugiert, gießt die überstehende Flüssigkeit ab und löst das Präzipitat in einigen ml Natriumborat-Puffer $p_H = 10,0$ nach SOERENSEN und CLARK. Die resultierende Flüssigkeit, die gleichmäßig grün ist, reagiert sehr gut mit Benzidin und weist das charakteristische Spektrum auf.

B. Elektrophoretische Trennung

Es werden außer den obengenannten Substanzen Hämoglobin und Methämoglobin angewendet.

Die experimentellen Bedingungen sind folgende: Elektrophoresezeit 14 Std; Stromstärke 145 Volt; Veronalpuffer p_H 8,6; Wathman Papier Nr. 1; Entwickler: alkoholische Lösung gesättigt mit Benzidin + 3% H_2O_2 + Essigsäure (Tropfen); Diaphanisator: Vaselineöl + α -Monobromnaphthalin.

C. Extraktion der grünen Hämopigmente aus den faulen Organen und elektrophoretische Trennung

Die Forschungen sind ausschließlich an menschlichen Leichen durchgeführt worden. Dabei standen 9 Leichen zur Verfügung, bei welchen je 10 Organuntersuchungen gemacht wurden, so daß ein Komplex von etwa 100 Versuchen vorliegt. Das Datum des jeweiligen Exitus schwankt zwischen einem Minimum von 5 bis 6 Tagen und einem Maximum von 60 Tagen.

Die examinierten Organe waren: Gehirn, Dura mater, Milz, Niere und Haut.

Es wurde auch eine Rinderleber untersucht, die wir *in vitro* hatten faulen lassen.

Die organische Substanz wird zerrieben, homogenisiert, mit Quarzsand zerstoßen und gefriergetrocknet. Ist das Ausgangsmaterial besonders fettreich (z. B. Subcutis) oder lipidreich (z. B. Leber, Niere), so empfiehlt sich eine vorherige Entfettung mit Äther im Soxhlet. Handelt es sich um Gehirn, so wird die Anwendung von Äther mit wiederholten Extraktionen mit reinem Äthylalkohol gekoppelt, was eine beachtliche Reduktion des Volumens der Substanz bewirkt.

Das Trockenmaterial, das aus der Gefrier Trocknung hervorgeht, wird weiter zerstoßen und erhält ein fadenförmiges Aussehen, sofern es sich um Haut handelt, ein pulverartiges bei parenchymatösen Organen. Man entfettet erneut mit Äther im Soxhlet, bis die Lösung klar ist. Die fettangereicherte, ätherische Flüssigkeit ergibt keine Benzidinreaktion und kann ohne weiteres abgegossen werden.

Die derartig gereinigte organische Substanz wird nach vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels 5 min lang zuerst in Phosphatpuffer p_H 6,6 und anschließend in Natriumboratpuffer p_H 10,0 nach SOERENSEN und CLARK maceriert. Zwischen beiden Behandlungen wird eine rasche Wäsche mit destilliertem Wasser über Glasfilter oder Tiegel nach GOOCH, unter Zuhilfenahme der Vakuumpumpe, eingeschoben.

Die Resultate sind folgende:

Gehirn: bei p_H 6,6 Spuren von Hämoglobin und Sulfhämoglobin; bei p_H 10,0 Spuren von Choleglobin und Methämoglobin;

Dura mater: Pigment in spärlicher Menge: bei p_H 6,6, Dominanz von Sulfhämoglobin mit Spuren von Choleglobin; bei p_H 10,0 sind sowohl Choleglobin als auch Hämoglobin deutlich;

Hepar bovinum *in vitro* gefault: bei p_H 6,6 Sulfhämoglobin, Hämoglobin, Methämoglobin, Choleglobin und ein unbekanntes Pigment; bei p_H 10,0 Sulfhämoglobin, Hämoglobin, Methämoglobin und ein unbekanntes Pigment;

Milz: bei p_H 6,6 Choleglobin, Spuren von Sulfhämoglobin und ein unbekanntes Pigment; bei p_H 10,0 Choleglobin;

Niere: bei p_{H} 6,6 Choleglobin; bei p_{H} 10,0 Choleglobin und Methämoglobin;

Haut: vorwiegend Choleglobin mit Spuren von Sulfhämoglobin; auch Methämoglobin und Hämoglobin sind vorhanden.

Diskussion

Auf Grund der experimentellen Resultate läßt sich bestätigen, daß im grünen Leichenpigment eine Mischung von Hämoglobin, Methämoglobin, Choleglobin, Sulfhämoglobin vorhanden ist, welcher sich hin und wieder eine unbekannte Substanz, die eine maximale anodische Dislokation aufweist, beifügt.

Die Dominanz von Choleglobin erlaubt den Rückschluß, daß es sich nicht um eine reine und einfache Reaktion zwischen Hämoglobin und Schwefelwasserstoff handelt, wie es der klassischen Ansicht über Sulfhämoglobin entspräche, sondern vielmehr um einen tatsächlichen Hämoglobin-Katabolismus, der wahrscheinlich den frischen Vital-Aktivitäten, die sich in der Leiche ansiedeln, zuzuschreiben ist.

Man kann daher annehmen, daß der *Hämoglobinabbau* sowohl beim *Lebenden* als auch bei der *Leiche* nach einem *einzigsten Schema* abläuft — wenigstens innerhalb gewisser Grenzen.

Beim Lebenden ist das Choleglobin physiologisch und stellt ein Zwischenprodukt bei der Bildung der biliären Pigmente dar; bei der Leiche ist es praktisch ein terminales Produkt, da die Leichenveränderungen die letzten Stufen des *Cyclus* unterbinden.

Daß das Choleglobin sich vorwiegend im hämolysierten, stromalosen Blut bildet, erklärt, warum das Grünpigment zuerst in den Zonen mit Extravasation von pigmentärer Flüssigkeit und in parenchymatösen Organen mit ausgedehntem Capillarsystem auftritt.

Das Leichen-Methämoglobin läßt sich, sofern in vivo keine toxische oder pathologische Methämoglobinämie vorhanden war, als Zwischenprodukt bei der Reihe der Reaktionen, die zum Choleglobin führen, erklären.

Da das Fe im Choleglobin leicht abspaltbar ist („easily detachable Iron“ der angelsächsischen Verfasser) erklärt sich die nachträgliche Bildung eines schwärzlichen Farbtones, der durch Schwefeleisen hervorgerufen ist.

Die choleglobinämische Deutung des grünen Leichenpigments löst auch die Frage, warum die Haut sich früher als der Darm grün verfärbt, da diese dem Schwefelwasserstoff mehr ausgesetzt ist, und wird ebenfalls durch die Tatsache bestätigt, daß auch in vitro die Reaktion des H_2S mit Hämoglobin einen gewissen Prozentsatz von Choleglobin bildet.

Literatur

DALLA VOLTA, A.: Nuovi aspetti del problema delle solfocombinazioni emoglobiniche. *Arch. di Antrop. crim.* **46**, 383 (1926). — LEMBERG, R., u. J. W. LEGGE: Hematin compounds and bile pigments. New York: Interscience Publ. 1949. — PALMIERI, V. M., u. C. ROMANO: Gli emopigmenti verdi cadaverici. Relazione al XIII Congr. della Società italiana di Medicina Legale, Palermo, settembre 1956. — ROMANO, C., e J. A. CALABUIG: Natura elettroforetica degli emopigmenti verdi cadaverici. *Arch. Ist. biochim. ital.* **17**, 201 (1955). — SCHMIDT, O.: Die Bildung von Sulfhämoglobin in der Leiche. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **27**, 372 (1932).

Prof. Dr. V. M. PALMIERI und Privatdozent Dr. CARLO ROMANO,
Napoli, Via Luciano Armanni 5
