

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. WEINIG)

Studien über das Verhalten von Hämatin in alterndem Blutserum

Von

WOLFGANG SCHWERD

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. August 1957)

Das postmortale Verhalten der Blutfarbstoffderivate ist recht verschieden. Kohlenoxydhämoglobin ist bekanntlich sehr lange haltbar. Andere Hämoglobinabkömmlinge dagegen, wie z. B. Methämoglobin und Hämatin, sind zwar bei verschiedenen Krankheiten, insbesondere aber

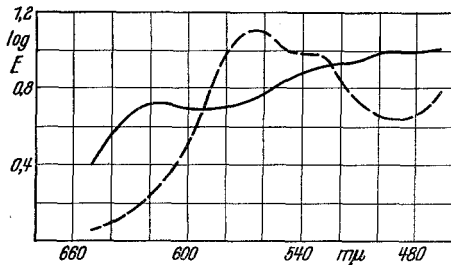


Abb. 1. Serumhämatin. In $n/10$ NaOH gelöstes Häm in frischem Serum; pH 7,5—8 (ausgezogene Linie). Konzentration etwa 0,1%. Gestrichelte Linie: Dasselbe nach Reduktion mit $Na_2S_2O_4$. (Typische Farbkurven)

bei allen Vergiftungen, die mit Blutzerfall einhergehen, schon intravital zu beobachten, sie treten aber auch bei Autolyse (DOLJANSKI und KOCH, FAIRLEY) und Fäulnis auf. Bei Untersuchungen über die Nachweisbarkeit des Hämatins sind wir der Frage nachgegangen, wie sich Hämatin im Blutserum verhält.

Hämatin geht, wie zuerst HEILMEYER feststellte, mit

den Serumeiweißkörpern eine Verbindung ein und ändert dabei seine spektralen Eigenschaften. Nach unseren Beobachtungen verbindet sich dieser Farbstoff nicht nur mit dem Albumin, wie FAIRLEY u. a. annahmen, sondern auch mit Globulinen (SCHWERD). In weiteren Versuchen über das optische Verhalten des Hämatins im Blutserum zeigte sich nun, daß die Absorptionskurven sich in gealterten Serumproben anders verhalten als in frischen. In frischem Serum gelöstes Hämatin ergab folgenden Absorptionsverlauf (Abb. 1). Im roten Spektralteil ist eine relativ schwache Absorptionsbande mit Maximum bei $620 m\mu$ vorhanden. Nach einem flachen Minimum im Gelbgrün nimmt die Absorption langsam zu, wobei sich zwei ange deutete Maxima bei $525-530 m\mu$ und bei $495 m\mu$ abzeichnen (Abb. 1, ausgezogene Linie).

Nach Reduktion (mit Natriumdithionit) fehlt eine stärkere Absorption im Rot, im Gelb steigt die Absorptionskurve an, bildet einen relativ breiten Gipfel mit Maximum bei $565\text{ m}\mu$, verläuft etwa von 545 bis $530\text{ m}\mu$ waagrecht und senkt sich dann bis zu einem Minimum bei $490\text{ m}\mu$, um erneut stark anzusteigen (Abb. 1, gestrichelte Linie).

Weiter rotwärts als 566 — $568\text{ m}\mu$ war das Maximum bei unseren Versuchen nie zu finden. Dagegen war es manchmal etwas violettwärts gegen $560\text{ m}\mu$ hin verschoben. Nach einiger Zeit stellte sich nun heraus, daß dies immer dann der Fall war, wenn Seren Verwendung fanden, die bereits einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt waren, niemals dagegen bei ganz frischem Serum oder Plasma. Neben einer Verschiebung des Maximums waren regelmäßig auch gestaltliche Veränderungen der Farbkurven festzustellen, die jedoch nur nach Reduktion auffielen (Abb. 10). Zur Erklärung dieser gestaltlichen Veränderungen ist es erforderlich, den Absorptionsverlauf des Serumeiweißhämochromogens mit heranzuziehen und die Bedingungen zu besprechen, unter denen sich dieser Farbstoff entwickelt.

Die Hämochromogenbildung

Wie bereits HOPPE-SEYLER erkannte, entsteht bei der Reduktion von Hämatin nur dann Hämochromogen, wenn Eiweiß vorhanden ist. Spätere Untersuchungen (ANSON und MIRSKY u. a.) zeigten, daß an Stelle von Eiweiß auch andere stickstoffhaltige Körper wie Ammoniak, Amine, Aminosäuren, Hydrazinhydrat, Pyridin, Nicotin usw. treten können. (Bei eigenen Untersuchungen ergab sich allerdings, daß reinste Aminosäuren [Merek] mit Hämatin keine Verbindungen eingehen.)

Die neuerdings von FELIX geäußerte Meinung, daß alle Hämochromogene dasselbe Spektrum haben, trifft nicht zu. Ihre Spektren sind sich nur sehr ähnlich. Dies gilt besonders für die Eiweißhämochromogene, die sich unter sonst gleichen Bedingungen nur hinsichtlich der Intensität der Ausprägung der typischen Farbkurve unterscheiden, während die Lage der Absorptionsmaxima übereinstimmt. Dagegen differieren beispielsweise die Absorptionsmaxima des Serumhämochromogens im sichtbaren Licht je um $2,5\text{ m}\mu$ von denen des Ammoniakhämochromogens, wie schon ANSON und MIRSKY beobachteten.

Hämochromogen bildet sich bekanntlich nur im alkalischen Milieu. Wie aber oben am Beispiel des Hämatins in frischem Serum gezeigt wurde, tritt nach Reduktion mit Natriumdithionit nicht ohne weiteres ein Hämochromogenspektrum in Erscheinung. Zwischen $\text{pH } 7$ — 10 entwickelt sich vielmehr, wie entsprechende Versuche ergaben, das beschriebene Spektrum des reduzierten Serumhämatins (Serumbäms), dem die charakteristischen Absorptionsbanden der Eiweißhämochromogene (bei 558 und $528\text{ m}\mu$) fehlen (Abb. 1, gestrichelte Linie). Durch starkes Alkalisieren ändert sich der Verlauf der Absorptionskurve. Es bildet sich das Absorptionsspektrum des Serumeiweißhämochromogens aus (Abb. 2, strichpunktierte Linie).

Die Hämochromogenspektren in verschiedenen Eiweißlösungen

Bei Untersuchungen über die Bindung des Hämatins an Serum-eiweißkörper, prüften wir auch die Hämochromogenbildung in den verschiedenen Eiweißfraktionen¹. Es wurde dabei in der Weise vorgegangen, daß zunächst die Absorptionsspektren nach Zusatz des in $n/10$ NaOH gelösten Farbstoffes zu der Eiweißlösung spektrophotometrisch (Spektralphotometer Zeiß-Opton) gemessen wurden. (Das p_H dieser Lösungen, welches jeweils überprüft wurde, lag zwischen 7,5

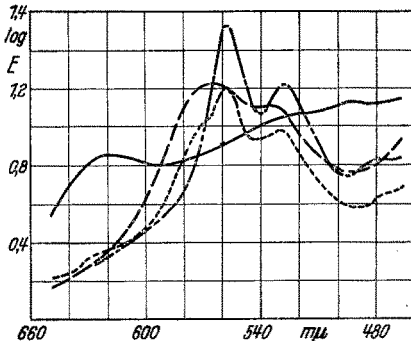


Abb. 2

Abb. 2. Serumhämatin. Ausgezogene und gestrichelte Linie wie in Abb. 1 (unreduzierter bzw. reduzierter Farbstoff). Strichpunktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10 %iger NaOH/ml Serum stark alkalisiert. Punktierte Linie: Dasselbe mit 3 %iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis p_H 7,5—8. (Typische Farbkurven)

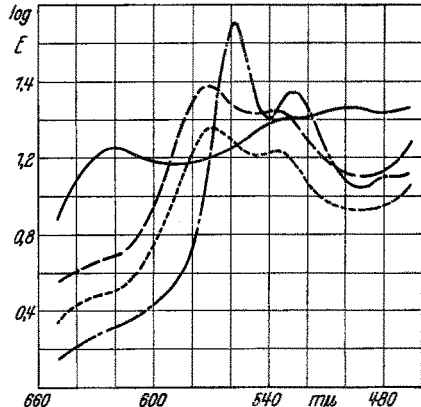


Abb. 3

Abb. 3. Hämatinalbumin. Ausgezogene Linie: In $n/10$ NaOH gelöster, unreduzierter, gestrichelte Linie: reduzierter Farbstoff in 4 %iger Humanalbumin-Lösung (Behringwerke). Konzentration etwa 0,1 %. p_H : 7,5—8. Strichpunktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10 %iger NaOH/ml Lösung stark alkalisiert. Punktierte Linie: Dasselbe mit 3 %iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis p_H 7,5—8. (Typische Farbkurven)

und 8.) Sodann wurde mit Natriumdithionit reduziert und die Farbkurve erneut ermittelt. Weitere spektrophotometrische Bestimmungen erfolgten nach dem Alkalisieren der Lösungen mit NaOH und schließlich nach Rückpuffern mit HCl bis p_H 7,5—8. Die vor dem Alkalisieren zu beobachtenden Absorptionsspektren und die hieraus zu ziehenden Schlüsse über die Bindung des Hämatins an Serum-eiweißkörper haben wir an anderer Stelle eingehend besprochen (SCHWERD). Hierbei wurde die Feststellung getroffen, daß Hämatin nicht nur mit Albumin, sondern auch mit Globulinen Verbindungen eingeht. Die bei stark alkalischer Reaktion sich entwickelnden Hämochromogenspektren der verschiedenen Eiweißkörper haben zwar, wie die Abb. 2—7 zeigen, die beiden

¹ Die Eiweißfraktionen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. SCHULTZE, Behringwerke, Marburg a. d. Lahn, überlassen, wofür wir auch an dieser Stelle ergebenst danken.

Maxima an gleicher Stelle, doch unterscheiden sich die typischen Farbkurven hinsichtlich ihrer Intensität ganz erheblich voneinander¹. Während in α_2 - und β_1 -Globulinlösungen äußerst intensive Absorptionsspektren zustande kamen (Abb. 5 und 6), entwickelte sich in der γ -Globulinlösung ein Hämochromogenspektrum nur andeutungsweise (Abb. 7). Man ist daher versucht anzunehmen, daß γ -Globulin unter den gegebenen Umständen kein Hämochromogen bildet, daß vielmehr die

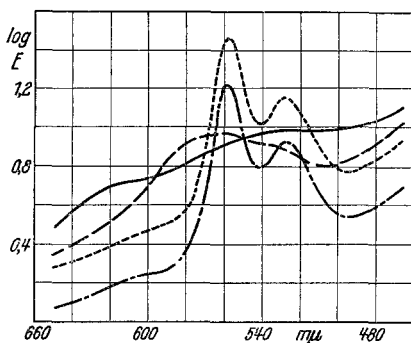


Abb. 4

Abb. 4. Hämatin in 1,5%iger α_2 -Glykoproteinfraktion (Behringwerke) pH 7,5—8 (ausgezogene Linie). Hämatingonzentration etwa 0,1%. Gestrichelte Linie: Dasselbe nach Reduktion. Punktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10%iger NaOH/ml Lösung stark alkalisiert. Strichpunktierte Linie: Dasselbe mit 3%iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis pH 7,5—8. (Typische Farbkurven)

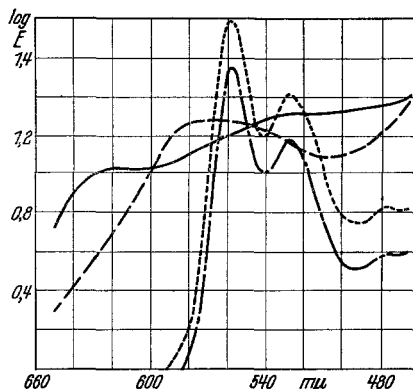


Abb. 5

Abb. 5. Hämatin in 1,5%iger α_2 -Glykoproteinfraktion (Behringwerke) pH 7,5—8 (ausgezogene Linie). Hämatingonzentration etwa 0,1%. Gestrichelte Linie: Dasselbe nach Reduktion. Punktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10%iger NaOH stark alkalisiert. Strichpunktierte Linie: Dasselbe mit 3%iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis pH 7,5—8. (Typische Farbkurven)

erhobenen Befunde durch geringe Verunreinigungen mit anderen Eiweißkörpern bedingt sind. Die Hämochromogene des Serums, des Albumins und der α_1 -Globulinfraktion nehmen hinsichtlich ihrer Ausprägung Zwischenstellungen ein².

¹ Da nur dann ein klares Bild darüber zu gewinnen ist, ob Absorptionsspektren identisch sind oder nicht, wenn sie nach einem Verfahren aufgezeichnet werden, das von Konzentrationseinflüssen unabhängig ist, haben wir die Absorptionskurven als „typische Farbkurven“ gezeichnet. Hierbei wird im Koordinatensystem der Logarithmus der Extinktion als Ordinate eingetragen. Die Konzentration kommt dann nur noch in der Höhenlage der Kurve zum Ausdruck, ist aber für die Form der Kurve nicht von Bedeutung (HEILMEYER).

² Es muß hier ausdrücklich angemerkt werden, daß bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Absorptionskurven stets Vergleichslösungen verwendet wurden, die bis auf den Hämatingehalt völlig gleichartig wie die Meßlösungen zusammengesetzt waren. Außerdem wurden nur die Ergebnisse von Lösungen verwertet, die nicht nennenswert getrübt waren.

Es zeigt sich also, daß die Ausprägung der Hämochromogenspektren von der *Eiweißart* mit bestimmt wird. Auch andere Faktoren sind hierfür maßgebend. So wies bereits 1936 O. SCHMIDT darauf hin, daß die Bildung des Eiweißhämochromogens von der Serumbeschaffenheit abhängig ist. Er fand beispielsweise nur schwache Hämochromogenschatten, wenn er ungekochtes Serum an Stelle von Serum verwendete, das in $n/10$ NaOH gekocht war. Für die Unterschiede hat vielleicht

auch die Frage der Denaturierung des Eiweißes eine Rolle gespielt, worauf im folgenden eingegangen wird.

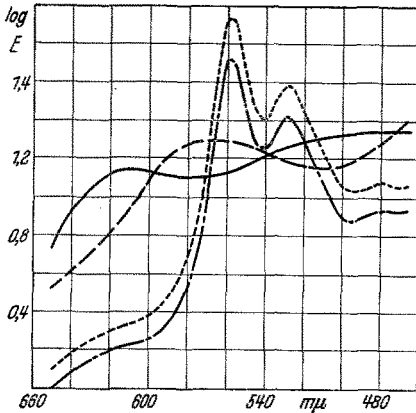


Abb. 6

Abb. 6. Hämatin in 1,5%iger β_1 -Globulinlösung (Behringwerke) p_H 7,5—8 (ausgezogene Linie). Hämatingonzentration etwa 0,1%. Gestrichelte Linie: Dasselbe nach Reduktion. Punktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10%iger NaOH stark alkalisiert. Strichpunktierte Linie: Dasselbe mit 3%iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis p_H 7,5—8. (Typische Farbkurven)

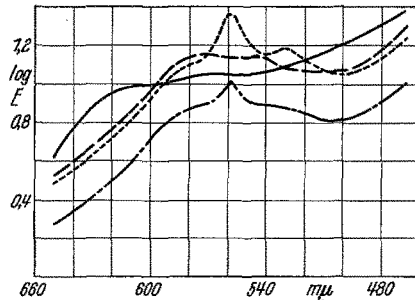


Abb. 7

Abb. 7. Hämatin in 4%iger γ -Globulin-Lösung (Behringwerke) p_H 7,5—8 (ausgezogene Linie). Hämatingonzentration etwa 0,1%. Gestrichelte Linie: Dasselbe nach Reduktion. Punktierte Linie: Reduzierter Farbstoff durch Zugabe von 2 Tropfen 10%iger NaOH/ml Lösung stark alkalisiert. Strichpunktierte Linie: Dasselbe mit 3%iger HCl vorsichtig wieder angesäuert bis p_H 7,5—8. (Typische Farbkurven)

Das Verhalten verschiedener Hämochromogene bei Rückverschiebung des p_H -Wertes zum schwach alkalischen Milieu (p_H 7,5—8)

Ein interessantes Verhalten zeigen die Absorptionsspektren der verschiedenen Eiweißhämochromogene, wenn man die Lösungen durch vorsichtiges Zusetzen von 3%iger Salzsäure wieder auf den Ausgangs- p_H -Wert zurückpuffert. Während das durch starkes Alkalisieren des reduzierten Hämatalbumins entstandene Hämochromogen sein optisches Verhalten beim Rückpuffern in der Weise ändert, daß das Spektrum des reduzierten Hämatalbumins praktisch vollständig wieder in Erscheinung tritt (Abb. 3), gelingt etwas Entsprechendes beim Serumhämochromogen nur unvollständig (vgl. Abb. 2) und bei den Hämochromogenen der α_1 -, α_2 - und β_1 -Globulinfraktion überhaupt nicht (vgl. Abb. 4—7; in diesen Zeichnungen sind die Absorptionskurven aus Grün-

den der Übersichtlichkeit etwas gegeneinander versetzt). Die durch Zusatz von Natronlauge zu Hämatineiweißgemischen entstandenen Veränderungen im optischen Verhalten (Hämochromogenbildung) sind also nur bei der Albuminverbindung reversibel, bei den Globulinverbindungen offensichtlich irreversibel.

Welche Veränderungen liegen diesem verschiedenartigen Verhalten verschiedener Eiweißkörper unter sonst gleichen Umständen zu-

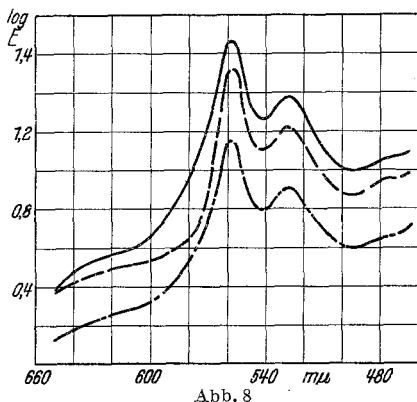


Abb. 8

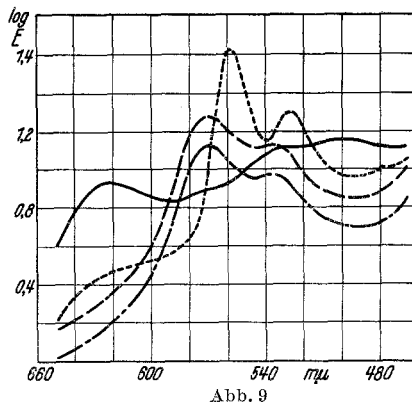


Abb. 9

Abb. 8. Hämatin in 1,5%iger β_2 -Globulin-Lösung. Ausgezogene Linie: Globulinlösung 12 Std mit NaOH versetzt, dann bis p_H 7,5—8 angesäuert, Hämatin zugegeben und reduziert. Gestrichelte Linie: Dasselbe durch Zusatz von 2 Tropfen 10%iger NaOH/ml Lösung alkalisiert. Strichpunktierte Linie: Dasselbe wieder angesäuert bis p_H 7,5—8. (Typische Farbkurven)

Abb. 9. Hämatin in 4%iger Albumin-Lösung, die 10 Std lang mit 5 Tropfen 10%iger NaOH/ml Lösung versetzt, vor dem Hämatinzusatz jedoch durch Zugabe von 3%iger HCl auf einen p_H -Wert von 7,5—8 eingestellt wurde. Ausgezogene Linie: Farbstoff vor der Reduktion. Strichpunktierte Linie: Farbstoff nach der Reduktion. Punktierte Linie: Reduzierter Farbstoff nach Alkalisieren. Gestrichelte Linie: Zuerst Hämatinzusatz und vorsichtig bis zu einem p_H -Wert von 7,5—8 wieder angesäuert. (Typische Farbkurven)

grunde? Zunächst wird man daran denken müssen, daß die im stark alkalischen Milieu entstandenen Globulin-Hämochromogene stabilere Verbindungen als das Albumin-Hämochromogen sind. Folgende Versuche beweisen aber, daß diese Erklärung nicht stichhaltig ist. Alkaliisiert man nämlich eine Globulinlösung und bringt sie vor dem Hämatinzusatz durch vorsichtigen Säurezusatz wieder auf einen p_H -Wert von 7,5—8, setzt nun Hämatin zu und reduziert, so bildet sich ein Hämochromogenspektrum von gleicher Intensität wie im stark alkalischen Milieu aus (Abb. 8). Nimmt man dagegen das gleiche mit Albumin vor, so entsteht nach wie vor das Spektrum des reduzierten Hämatalbumins und nicht das des Albuminhämochromogens. Selbst nach 10 Std langem Einwirken von Natronlauge auf eine Albuminlösung gelang es, nach dem Rückpuffern in den schwach alkalischen Bereich das Absorptionsspektrum des reduzierten Hämatalbumins fast vollständig wieder

zur Darstellung zu bringen (Abb. 9). Lediglich das 1. Maximum war um einen Betrag von etwa $2\text{ m}\mu$ violettwärts verschoben, was übrigens schon nach kurzfristigem Alkalisieren zu beobachten war (Abb. 3, punktierte Linie) und wahrscheinlich auf geringe Verunreinigungen mit anderen Eiweißfraktionen zurückzuführen ist. Erst wenn die mit Alkali versetzte Albuminlösung stark erhitzt wurde, entstanden Veränderungen, die nach Hämatinzusatz und Reduktion auch im schwach alkalischen Milieu zur Entwicklung des Albuminhämochromogenspektrums Anlaß gaben. In der Hitze kommt also eine tiefer greifende Veränderung des Albumins als beim bloßen Alkalisieren zustande, die unter den aufgezeigten Bedingungen *irreversibel* ist.

Es liegt nahe, diese Veränderungen als *Denaturierung* zu bezeichnen und zwischen reversibler und irreversibler Denaturierung zu unterscheiden. Dementsprechend ergibt sich eine Übereinstimmung mit Ausdrucksweisen in der Literatur, in der vielfach die Eiweißhämochromogene mit dem Beiwort „denaturiert“ bezeichnet werden (vgl. z. B. KEILIN, LEMBERG und LEGGE), ohne daß bisher auf den Einfluß des p_H -Wertes und der Eiweißqualität auf die Hämochromogenbildung und -beständigkeit näher eingegangen worden wäre.

Gemäß dieser Ausdrucksweise ist zu sagen, daß die Eiweißkörper im nativen Zustand bei schwach alkalischer Reaktion (unter p_H 10) mit reduziertem Hämatin (Häm) *kein* Hämochromogen bilden. Sie sind hierzu erst nach starkem Alkalisieren und dadurch bedingter, allenfalls reversibler (wie z. B. beim Albumin) Denaturierung fähig. Bei irreversibel denaturierten Eiweißkörpern besteht dagegen diese p_H -Abhängigkeit nicht mehr. Nunmehr erfolgt die Hämochromogenbildung schon im schwach alkalischen Milieu.

Das Zustandekommen eines Hämochromogenspektrums im schwach alkalischen Milieu (p_H 7—10) nach Zusatz von Hämatin zu einer Eiweißlösung und Reduktion mit Natriumdithionit spricht somit für das Vorliegen von denaturiertem Eiweiß.

Das Verhalten des Hämatins im alternden (autolysierenden und faulenden) Serum

Bei unseren Untersuchungen bestimmten wir, wie erwähnt, den Maximalpunkt des breiten Gipfels des reduzierten Serumhämatins nie weiter rotwärts als $566\text{—}568\text{ m}\mu$. Er war vielmehr manchmal etwas violettwärts gegen $560\text{ m}\mu$ hin verschoben. Nach einiger Zeit fiel auf, daß die Verschiebung des Maximums zum Violett hin nur bei Seren auftrat, die bereits einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, niemals dagegen bei ganz frischen Seren und frischem Plasma.

Die Gegenüberstellung der typischen Farbkurven des reduzierten Hämamins in diesen älteren Seren mit den im frischen Serum ergab außer Verlagerungen des Gipfelpunktes auch Veränderungen in der Form. Es würde zu weit gehen, alle möglichen Zwischenstadien aufzuzeigen, die beginnend mit ganz geringfügigen Verschiebungen des Maximalpunktes ohne sonstige nennenswerte gestaltliche Veränderungen der

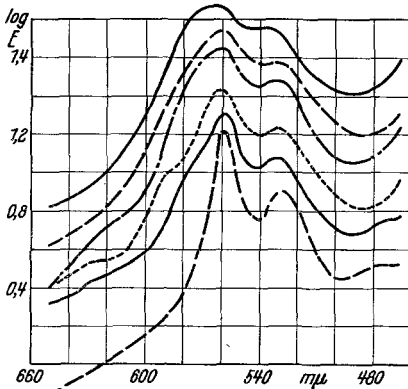


Abb. 10

Abb. 10. 1. Kurve (ausgezogene Linie oben): Reduziertes Serumhämatin. 2. Kurve (gestrichelte Linie oben): Reduziertes Hämatin in 6 Tage altem (klarem), überwiegend im Kühlschrank aufbewahrtm Serum. 3. Kurve (strichpunktierte Linie): Gleiches Serum wie Kurve 1, jedoch $3\frac{1}{2}$ Std lang mit NaOH versetzt, vor der Hämatinzugabe aber durch Ansäuern auf einen pH-Wert von 7,5—8 eingestellt. 4. Kurve (punktierte Linie): Reduziertes Hämatin in 11 Tage altem, vorwiegend im Kühlschrank aufbewahrtm Serum. 5. Kurve (ausgezogene Linie unten): Serum mit Hämatin versetzt, reduziert, alkalisiert und dann wieder angesäuert bis pH-7,5—8. 6. Kurve (gestrichelte Linie unten): Serumhämochromogen. (Typische Farbkurven)

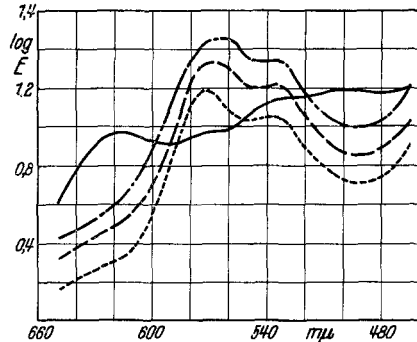


Abb. 11

Abb. 11. Hämatin in 10 Tage altem, bei Zimmertemperatur faulendem Serum (Konzentration etwa 0,1 %). Ausgezogene Linie: Vor Reduktion; gestrichelte Linie: Nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. (Serum mußte vor dem Hämatinzusatz wegen Trübung zentrifugiert werden.) Zum Vergleich: Reduziertes Serumhämatin (strichpunktierte Linie) und reduziertes Hämatalbumin (punktierte Linie). (Typische Farbkurven)

Farbkurve über die in Abb. 10, Kurve 2 (gestrichelt) dargestellte Absorptionskurve eines 6 Tage alten Serums bis zu der in Abb. 10, Kurve 4 (punktiert) eingezeichneten Farbkurve eines 11 Tage alten Serums führen. Nach unseren im vorangegangenen Kapitel gemachten Ausführungen ergeben sich keine Schwierigkeiten hinsichtlich der Deutung dieser Befunde. Die Absorptionskurven entsprechen denen einer Mischung von reduziertem Serumhämatin und Serumhämochromogen. Da im schwach alkalischen Milieu, wie gezeigt wurde, nur denaturiertes Eiweiß mit reduziertem Hämatin unter Hämochromogenbildung reagiert, glauben wir den Schluß ziehen zu dürfen, daß die gestaltlichen Veränderungen der Absorptionskurven in älteren Seren Ausdruck einer partiellen Eiweißdenaturierung sind. Unsere Auffassung wird dadurch gestützt, daß es gelingt, durch Hintereinanderschalten von Cuvetten, die einerseits

Serumhämatin, andererseits Serumhämochromogen enthalten, gleichartige Absorptionskurven zur Darstellung zu bringen. Aber nicht nur das. Auch experimentell lassen sich entsprechende Farbkurven erhalten, wie dies beispielsweise Abb. 10, Kurve 3 (strichpunktiert) zeigt, die von einem Serum stammt, das $3\frac{1}{2}$ Std mit Natronlauge versetzt worden war, vor der Häminzugabe aber durch vorsichtiges Zufügen von HCl wieder auf einen p_H -Wert von 7,5—8 eingestellt wurde. Als weiterer Vergleich ist in Abb. 10, Kurve 5 (ausgezogen) eine Farbkurve eingezeichnet, die von einem Serum stammt, das in stark alkalischem Milieu mit Hämatin versetzt, reduziert und vor der Messung wieder auf einen p_H -Wert von 7,5—8 gebracht wurde.

Bei der Alterung des Serums entstehen also ganz ähnliche Veränderungen der Serumeiweißkörper, wie wir sie bei der Alkalibehandlung experimentell erzeugen können. Da, wie gezeigt wurde, hierbei unter den gegebenen Umständen (Alkalieinwirkung bei Zimmertemperatur) nur die Globuline angegriffen werden, scheint uns bei der großen Ähnlichkeit der Absorptionskurven des gealterten und des alkalibehandelten Serums der Schluß gerechtfertigt, daß auch bei Alterung zunächst nur Veränderungen der Globuline zustande kommen. Sie führen bei reiner Autolyse bis zu Befunden, wie sie zu erhalten sind, wenn der gesamte Globulinbestand des Serums in Hämochromogen übergeführt ist (vgl. Abb. 10, Kurve 4 [punktiert] und 5 [ausgezogen]). Eine stärkere Verschiebung der Absorptionskurve des reduzierten Hämatins im Serum als zu der des Serumhämochromogens hin als Abb. 10, Kurve 4 haben wir unter autolytischen Bedingungen nicht gefunden.

Wurde Serum bei Zimmertemperatur der *Fäulnis* ausgesetzt, so ergaben sich zunächst Absorptionskurven wie bei Autolyse des Serums. Später trübte sich das Serum und konnte erst nach hochoptischem Zentrifugieren zur spektrophotometrischen Messung verwendet werden. Überraschenderweise war nun nach Hämatinzusatz und Reduktion nicht eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nach rechts zum violetten Ende des Spektrums hin, sondern im Gegenteil nach links eingetreten (vgl. Abb. 11, gestrichelte Kurve). Das Maximum lag bei 568 bis 570 $m\mu$, der Gipfel war im ganzen etwas schlanker als der des reduzierten Serumhämamins und bei 530 $m\mu$ zeichnete sich ein zweites flaches Maximum ab. Gestaltlich war keine Annäherung an das Hämochromogenspektrum zu finden wie bei den Versuchen mit autolyisiertem Serum, sondern vielmehr eine solche an das des reduzierten Hämatalbumins (vgl. Abb. 11, punktierte Linie). Auch die Farbkurve des nicht reduzierten Hämatins war in faulem Serum ähnlich der des Hämatalbumins. Das 1. Maximum lag zwar noch bei 620 $m\mu$, das 2. und 3. Maximum war dagegen etwas rotwärts verschoben (530 und 500 $m\mu$ — vgl. Abb. 11, ausgezogene Linie).

Dieses Verhalten des Hämamins im Serum läßt sich damit erklären, daß bei der Fäulnis des Serums die denaturierten Globuline teilweise zerstört wurden. Das Serumalbumin scheint somit ebenso wie gegen den Einfluß von Alkali auch gegen Fäulniseinflüsse resistenter als die Serumglobuline zu sein.

Zusammenfassung

Beim Zusammenbringen von reduziertem Hämatin mit Serumeiweißkörpern entwickeln sich im schwach alkalischen Milieu (p_H 7—10) nur dann Hämochromogenspektren, wenn die Eiweißkörper denaturiert sind. Globuline sind leichter denaturierbar als Albumine. Die Ausprägung der Hämochromogenspektren bei Darstellung der typischen Farbkurven hängt von der Natur des Eiweißes ab. γ -Globulin geht mit Hämatin keine sichere Verbindung ein.

Die Absorptionskurven des reduzierten Hämamins im autolysierenden Serum entsprachen denen einer Mischung von reduziertem Serumhämatin und Serumhämochromogen, was auf eine frühzeitige Denaturierung der Globulinanteile des Serums zurückgeführt wird. Faulende Seren lassen sich wegen Trübungen erst nach Zentrifugieren spektrophotometrisch untersuchen und zeigen dann mit reduziertem Hämatin Absorptionskurven, die derjenigen des reduzierten Hämatalbumins ähnlich sind.

Literatur

ANSON, M. L., u. A. E. MIRSKY: On haemochromogen and the relation of protein to the properties of the haemoglobin molecule. *J. of Physiol.* **60**, 50 (1925).
DOLJANSKI, L., u. O. KOCH: Das Blutserum als hämoglobintoxischer Faktor. *Virchows Arch.* **219**, 401 (1933). — FAIRLEY, N. H.: The spontaneous disintegration of certain blood pigments, with special reference to methaemalbumin formation. *Brit. J. Exper. Path.* **21**, 231 (1940). — FELIX, K.: In *Physiologische Chemie von FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ*, Bd. II, 1a, S. 517. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — HEILMEYER, L.: *Medizinische Spektrophotometrie*. Jena 1933. — KEELIN, J.: Reaction of human serum albumin with haematin and haem. *Nature (Lond.)* **154**, 120 (1944). — LEMBERG, R., u. J. W. LEGGE: Hematin compounds and blood pigments. New York 1949. — SCHMIDT, O.: Untersuchungen über Kohlenoxyd-Hämochromogene. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **27**, 81 (1937). — SCHWERD, W.: Die Bindung des Hämamins an Bleiweißkörper. Erscheint in *Z. physiol. Chem.*

Priv.-Doz. Dr. W. SCHWERD, Erlangen,
Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität