

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

Über die Bildung von Methämoglobin und Hämatin nach Einwirkung von Seife auf das strömende Blut und in vitro*

Von

W. SCHWERD und H. KECK

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Mai 1960)

Methämoglobin und Hämatin treten im Blut bei verschiedenen Erkrankungen und Vergiftungen auf. Sehr häufig sind es Krankheitszustände, die mit dem Zerfall von roten Blutkörperchen (= Hämolyse) einhergehen, wie z. B. perniziöse Anämie (HEILMEYER), Malaria und Schwarzwasserfieber (FAIRLEY u. BROMFIELD), hämolytischer Ikterus (DUESBERG), Ikterus neonatorum (ZETTERSTRÖM, STEMPFEL u. ESCARDO), akute gelbe Leberatrophie (BINGOLD), Lebercirrhose (v. D. BERG u. KAMERLING), Chromsäurevergiftung (SCHUMM) usw. Besonders bei der Seifenintoxikation ist das Auftreten dieser Blutfarbstoffderivate von mehreren Autoren erwähnt worden (HASELHORST u. SCHALTENBRAND, HASELHORST u. MERTENS, BINGOLD, HEITER, BOCK u. HEITER, HELLER u. a.). Es gehört als Kardinalsymptom zu diesem Krankheitsbild.

Quantitative Ergebnisse liegen bisher nur für Hämatin und auch hier nur in Form von grobquantitativen Schätzungen (nach dem Verfahren von SCHUMM) vor. Die zeitliche Reihenfolge des Auftretens und Verschwindens von Met-Hb und Hämatin (sowie Bilirubin) nach intravenöser Injektion von 5- bzw. 10%iger Schmierseifenlösung verfolgten HASELHORST u. MERTENS in Versuchen am Hund. Sie verabreichten insgesamt 100—330 mg Seife pro kg Körpergewicht. Sofort nach der Injektion war im Serum als Ausdruck einer Hämolyse Oxyhämoglobin nachzuweisen, nach etwa 15 min trat Met-Hb und nach 5—6 Std Hämatin auf. Beide Farbstoffe verschwanden nach etwa 24 Std wieder. Bilirubin war unter 6 Versuchen nur einmal in etwas vermehrter Menge zu finden.

Eigene Versuche

Wir prüften das Auftreten von Methämoglobin und Hämatin nach intravenösen Seifengaben bei Laboratoriumstieren (Kaninchen und weißen Mäusen), wobei wir quantitative Bestimmungen vornahmen.

* D 29.

1. Methoden

Die *Met-Hb-Werte* wurden nach dem Verfahren von KIESE ermittelt, das wir insofern modifizierten, als für jede Einzelbestimmung eine Eichkurve aufgestellt wurde. Dies bedeutet zwar eine Mehrbelastung, die aber ganz unerheblich ist und sich außerdem nicht umgehen läßt, weil wir bei zahlreichen Versuchen mit Menschen- und Tierblut (die inzwischen schon in die Hunderte gehen) immer wieder feststellen mußten, daß trotz konstanter Arbeitsweise die Fehlerschwankung sonst zu groß ist.

Im einzelnen gingen wir so vor:

Einige Tropfen Blut werden mit 10 ml Aqua dest. vermischt, bis eine fleischfarbene Lösung entsteht. Durch diese wird Leuchtgas geleitet. Anschließend werden dem Hämolystat 2 ml Phosphatpuffer (0,2 mol p_H 6,8) zugesetzt und die Mischung auf zwei Meßcuvetten verteilt. Die beiden Cuvetten werden im Photometer auf den Nullpunkt eingestellt. In der rechten Cuvette wird das vorhandene Methämoglobin mittels Natriumdithionit zu Hämoglobin reduziert und der Extinktionsunterschied gemessen. In der linken Cuvette wird das Hämoglobin mit 2 Tropfen einer 10%igen Kaliumferricyanidlösung zu Methämoglobin oxydiert. Diese Cuvette wird dann nach der Oxydation (= nach etwa 20 min) auf den Nullpunkt eingestellt und wiederum der Unterschied der Extinktion gemessen. Mit Hilfe dieses Meßergebnisses kann eine Eichkurve aufgestellt und der Prozentgehalt an Methämoglobin ermittelt werden. Die Messungen nahmen wir bei der Wellenlänge 546 $m\mu$ mit dem Photometer Eppendorf, bzw. bei 568 $m\mu$ mit dem Spektralphotometer vor.

Das *Hämatin* wurde nach der Methode von SCHWERD bestimmt: 0,3 ml Vollblut werden mit 0,6 ml Aqua dest. hämolysiert und 2 ml Essigsäure-Acetat-Pufferlösung (14,25 ml Eisessig, 61,2 g Natriumacetat, Aqua dest. ad 200) zugegeben. Nach 30—45 min wird die Lösung bei etwa 3000 Umdrehungen zentrifugiert und die überstehende klare Flüssigkeit abgegossen. Das Sediment wird sodann zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, dazwischen abzentrifugiert und schließlich in 2 ml Eisessig aufgelöst. Ist Hämatin vorhanden, so färbt sich der Eisessig je nach der vorhandenen Hämatinmenge schwach gelbbraun bis braun. Der Prozentgehalt wird colorimetrisch bestimmt. Als Vergleich dient eine Eisessiglösung mit bekannter Hämatingonzentration, wobei man einen entsprechenden Teil der Lösung des zu untersuchenden Blutes mit Eisessig versetzt und gut durchmischt. Es entsteht eine klare braune Lösung. Für eine 10%ige Vergleichslösung nimmt man den 10. Teil der zum Versuch benutzten Blutlösung (in unserem Falle 0,09 ml) und füllt mit Eisessig auf 2 ml auf.

2. Versuchsergebnisse

Die Einzelergebnisse sind in den Tabellen 1—11 aufgeführt. Sie zeigen, daß die *Met-Hb-Bildung* recht unterschiedlich verlief. Bei den ersten Versuchen mit dem gleichen Tier genügten meist niedrige Konzentrationen von 10—30 mg/kg Körpergewicht, um maximale *Met-Hb-Werte* von etwa 20% zu erreichen. Bei Wiederholungen mußten zur Erzielung gleich hoher Werte die Dosen verdoppelt bis verdreifacht werden. Es trat also anscheinend rasch eine gewisse Gewöhnung ein. Von der Verabreichung höherer Konzentrationen als 2% Kernseifenlösung mußten wir absehen, weil dies die Tiere nicht vertrugen, sondern plötz-

Tabelle 1. *Injektion von 10 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3200 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	22%	
1 Std	16%	
2 Std	11%	
4 Std	6%	0

Tabelle 2. *Injektion von 12 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3200 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	14%	
1 Std	19%	
3 Std 10 min	14%	
4 Std		0

Tabelle 3. *Injektion von 15 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3600 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	7%	
30 min	10%	
45 min	11%	
1 Std	9%	
1 Std 30 min	8%	
2 Std	6%	
4 Std		0

Tabelle 4. *Injektion von 28 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3600 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	3%	
45 min	7%	
1 Std 15 min	8%	
1 Std 30 min	Nachinjektion	
2 Std	10%	0
2 Std 15 min	8%	
3 Std 15 min	7%	8%
4 Std 45 min	6%	5%
5 Std 45 min	4%	2%

Tabelle 5. *Injektion von 22 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3100 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	8%	
30 min	12%	
45 min	12%	
1 Std	Nachinjektion	
1 Std 30 min	10%	0
2 Std 30 min	5%	0

Tabelle 6. *Injektion von 65 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3600 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
30 min	10%	
45 min	15%	
1 Std	12%	
1 Std 15 min		0
1 Std 30 min	Nachinjektion	
1 Std 45 min	12%	
2 Std	14%	
2 Std 15 min		0
2 Std 45 min	10%	
3 Std 15 min		0
4 Std 15 min	Nachinjektion	
4 Std 30 min		0
5 Std 30 min		0
7 Std 30 min		0
9 Std 15 min		0

lich unter Krämpfen zu Tode kamen. Aus dem gleichen Grunde mußten wir auch darauf verzichten, so viel Seifenlösung zu injizieren, daß höhere Met-Hb-Werte resultierten.

In Abb. 1 sind als Überblick über die Met-Hb-Bildung und Rückbildung nach einmaligen intravenösen Seifengaben beim Kaninchen die

Tabelle 7. *Injektion von 65 mg Kernseife pro kg Körpergewicht in 1%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3100 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	8 %	
45 min	7 %	
1 Std -	Nachinjektion	
1 Std 15 min	12 %	0
2 Std 15 min		0
4 Std 15 min		0

Tabelle 8. *Injektion von 55 mg Schmierseife pro kg Körpergewicht in 2%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3500 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	12 %	
30 min	13 %	
45 min		0
1 Std	Nachinjektion	
1 Std 15 min	17 %	
1 Std 45 min		0
2 Std 45 min		2 %
4 Std		0

Tabelle 9. *Injektion von 140 mg Schmierseife pro kg Körpergewicht in 4%iger Lösung beim Kaninchen. Gewicht: 3100 g*

Zeit	Met-Hb	Ht.
30 min	16 %	
1 Std	13 %	4 %
2 Std	7 %	6 %
3 Std	5 %	3 %
4 Std	3 %	0

Tabelle 10. *Injektion von 100 mg Schmierseife pro kg Körpergewicht in 2%iger Lösung bei der weißen Maus*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	9 %	0
30 min	10 %	3 %
45 min	17 %	6 %
1 Std	15 %	8 %
1 Std 30 min	7 %	10 %
2 Std	6 %	8 %
3 Std	4 %	6 %
5 Std	2 %	1 %

Tabelle 11. *Injektion von 250 mg Schmierseife pro kg Körpergewicht in 5%iger Lösung bei der weißen Maus*

Zeit	Met-Hb	Ht.
15 min	21 %	1 %
30 min	17 %	3 %
45 min	12 %	4 %
1 Std	10 %	6 %
1 Std 30 min	10 %	6 %
2 Std	7 %	4 %
3 Std	4 %	3 %

Durchschnittswerte von Versuchsreihe 1—3 graphisch dargestellt. Das Maximum der Met-Hb-Bildung war bei allen Versuchen rasch, meist nach 15—30, spätestens 45 min erreicht worden.

Hämatin trat beim Kaninchen nur zweimal auf (vgl. Tabelle 4 und 9). Das Ausmaß war mit maximal 8 % nicht erheblich, lag

aber fast in gleicher Höhe wie die zugehörigen Met-Hb-Werte. Dieses Blutfarbstoffderivat war erst später als Met-Hb nachzuweisen (bei Fall 4 erst nach der zweiten Injektion) und verschwand gleichzeitig mit diesem wieder aus dem Blutstrom.

Schmierseife schienen die Kaninchen besser zu vertragen als Kernseife. Dies zeigt insbesondere Fall 9, bei dem mehr als das 10fache von Fall 1 injiziert wurde (ohne daß höhere Met-Hb-Werte aufgetreten

wären). Hier kam es allerdings zur Hämatinbildung, was eine tiefer greifende Blutschädigung anzeigt.

Bei den Mäusen konnten wir wesentlich größere Seifenmengen verabreichen als beim Kaninchen (vgl. Tabelle 11). Die Tiere erhielten die Seifenlösung durch die Schwanzvene. Um genügend Blut zur Untersuchung zu erhalten, mußten wir so vorgehen, daß für jede Versuchsreihe 7 bzw. 8 Tiere verwendet wurden, denen gleiche Mengen 2- bzw. 5%iger Schmierseifenlösungen injiziert wurden. Die Berechnung der erforderlichen Mengen erfolgte nach dem Gewicht der Tiere. Die einzelnen Tiere wurden in verschiedenen zeitlichen Intervallen nach der Injektion getötet, der Methämoglobin- bzw. Hämatin Gehalt bestimmt und die Werte sodann chronologisch aneinandergereiht (Tabelle 10 und 11, Abb. 2).

Beim Methämoglobin zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei den Kaninchenversuchen: Zunächst ein rascher Anstieg und dann ein etwas verzögerter Abfall der Werte. Der Hämatin Gehalt nahm dagegen zunächst nur langsam zu und erreichte erst nach etwa $1\frac{1}{2}$ Std, also deutlich später als das Met-Hb die maximale Konzentration. Trotzdem lag der Zeitpunkt des Auftretens von Hämatin bei unseren Versuchen wesentlich früher als bei den Versuchen von HASELHORST u. MERTENS mit Hunden. Sie fanden es erst nach 5—6 Std.

Eine Beziehung zwischen den beiden Blutfarbstoffderivaten in der Form, daß eine Methämoglobin-Bildung in jedem Falle das Auftreten von Hämatin nach sich zieht, besteht sicher nicht, doch scheint das Umgekehrte regelmäßig der Fall zu sein: Einer Hämatinämie geht stets eine Methämoglobinämie voraus oder begleitet sie. Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Hämatinbildung die tiefer greifende (irreversible) Blutfarbstoffschädigung ist.

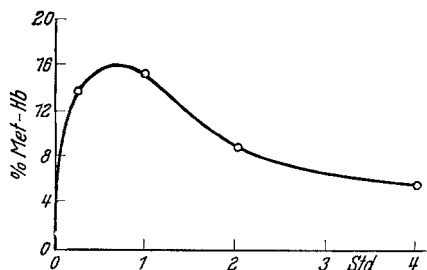


Abb. 1. Met-Hb-Bildung nach intravenöser Seifeninjektion beim Kaninchen. Mittelwerte aus den Versuchsreihen 1—3

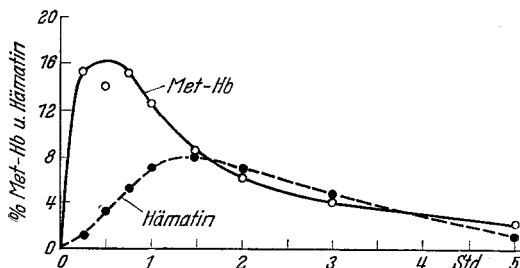


Abb. 2. Met-Hb- und Hämatin-Bildung nach intravenöser Seifeninjektion bei der weißen Maus. Mittelwerte aus den Versuchsreihen 10 und 11

Die von uns angewendeten Seifenmengen bewegten sich zwischen 10 und 250 mg/kg Körpergewicht. Sie lagen somit zum größeren Teil sicher weit über dem, was gewöhnlich bei Abtreibungshandlungen mit Seifenwasser verwendet wird. Hieraus allerdings Rückschlüsse auf die bei Seifenintoxikationen angewendeten Seifenmengen zu ziehen, erscheint uns deshalb nicht möglich zu sein, weil bisher keine quantitativen Vorstellungen über die Empfindlichkeit des Menschen gegenüber Seife bestehen.

Bei den *in vitro*-Versuchen waren zur Erzielung einer Methämoglobinbildung ganz besonders große Seifenmengen erforderlich. Wir konnten dabei keinen Unterschied feststellen, ob wir nun frisches Venenblut oder einige Tage altes Leichenblut verwendeten. Erst bei einem Mischungsverhältnis von 5% iger Schmierseifenlösung zu Blut wie 1:2 war eine deutliche Met-Hb-Bildung von etwa 8—10% nachzuweisen. Die Seifenmenge war also mehr als 100mal größer als sie zu einer gleich starken Met-Hb-Bildung beim lebenden Tier erforderlich war. Allerdings zeigte Tierblut (Kaninchen, Ratte) im Reagensglasversuch eine stärkere Met-Hb-Bildung nach Seifenzusatz als Menschenblut. Die Werte lagen aber auch hier weit unter denen nach gleich großen intravenösen Seifenverabreichungen. Wenn das Blut frisch genug war, sank der Met-Hb-Gehalt im Laufe der nächsten Tage ab, bei älterem Blut war dieser Effekt ebenso wie bei Hämoglobininlösungen, die aus gewaschenen Erythrocyten hergestellt worden waren, nicht so deutlich. Bei längerer Einwirkung von Seife auf das Hämoglobin treten andere Blutfarbstoffderivate auf, die wir im einzelnen noch nicht charakterisieren konnten. Hämatin scheint dabei nur eine geringe Rolle zu spielen.

Bei Einwirkung von Seife auf Hämoglobininlösungen (hergestellt aus gewaschenen Erythrocyten) statt auf Vollblut ergaben sich 3—4mal so hohe Met-Hb-Werte, was auf den Wegfall des schützenden Einflusses des Serumeiweißes zurückzuführen ist. So wurden z. B. bei einem Mischungsverhältnis von Seife zu Blut wie 1:2,5 im Vollblut 10%, in der Hämoglobininlösung dagegen 32% Met-Hb festgestellt. Der Gesamt-Hb-Gehalt war in beiden Fällen gleich hoch. Einen ähnlichen schützenden Effekt der Serumeiweißkörper beobachtete schon JARISCH bei Hämolyseversuchen mit Seife. Die Resistenz der Erythrocyten gegenüber Seife war beim Vorhandensein von Serum etwa 200mal höher als ohne dieses.

Zusammenfassung

Nach intravenöser Verabreichung von 1—5% iger Kern- bzw. Schmierseifenlösung in Mengen zwischen 10—140 mg/kg beim Kaninchen und 100—250 mg/kg bei der weißen Maus trat regelmäßig Methämoglobin im Blut auf. Der Maximalwert wurde gewöhnlich nach 15—30 min erreicht. Eine strenge Beziehung zwischen Seifenmenge und Met-Hb-Konzentration war nicht festzustellen. Erst nach Verabfolgung von größeren Seifenmengen bildete sich Hämatin, dessen maximale Konzen-

tration nach einmaliger Gabe von Seifenlösung nach etwa $1\frac{1}{2}$ Std zu beobachten war. Bei den in vitro-Versuchen waren wesentlich größere Seifenmengen zur Erzielung einer Met-Hb-Bildung erforderlich als bei den Experimenten am lebenden Tier.

Literatur

- BERGH, VAN DEN, u. KAMERLING: Ndd. Tschr. Geneesk. **78**, 4432 (1934). Zit. nach H. F. ZIFF, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 225 (1946).
- BINGOLD, K.: Folia haemat. (Lpz.) **42**, 192 (1930). Zit. nach H. F. ZIFF, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 225 (1946).
- BOCK, A., u. A. HEITER: Über die Wirkung der in den graviden Uterus instillierten Seifenlösung. Zbl. Gynäk. **70**, 53 (1948).
- DUESBERG, R.: Über die biologische Beziehung des Hämoglobins zu Bilirubin und Hämatin bei normalen und pathologischen Zuständen des Menschen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **174**, 305 (1934).
- FAIRLEY, N. H.: The spontaneous disintegration of certain bloodpigments with special reference to methämalbumininformation. Brit. J. exp. Path. **21**, 231 (1940).
- FAIRLEY, N. H., and R. J. BROMFIELD: The fate of extracorporeal circulating haemoglobin. Brit. med. J. **1940**, 213.
- HASELHORST, G., u. E. MERTENS: Die Einwirkung von Seife auf das Blut innerhalb der Gefäßbahn. Klin. Wschr. **1934**, 914.
- HASELHORST, G., u. G. SCHALTENBRAND: Vergiftungen von Schmierseife bei Abtreibungsversuchen und im Tierexperiment. Z. Geburtsh. Gynäk. **105**, 398 (1933).
- HEILMEYER, L.: Medizinische Spektrophotometrie. Jena: Gustav Fischer 1933.
- HEITER, A.: Der Seifenabort als eigenes Krankheitsbild. Geburtsh. u. Frauenheilk. **9**, 822 (1949).
- HELLER, L.: Chemisch-physiologische Untersuchungen bei Abtreibungen durch Seifenspülungen. Zbl. Gynäk. **71**, 934 (1949).
- HEUBNER, W., u. M. STUEHLMANN: Studien über Methämoglobinbildung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **199**, 1 (1942).
- JARISCH, A.: Beiträge zur Pharmakologie der Lipide. II. Mitt. Seife und Serum. Pflügers Arch. ges. Physiol. **194**, 337 (1922).
- KIESE, M.: Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämoglobin und Hämoglobin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **204**, 190 (1947).
- SAKURAI, K.: Über die Rückbildung des Methämoglobins. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **107**, 287 (1925).
- SCHUMM, O.: Hämatinämie bei toxischem Blutkörperchenzerfall. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **80**, 1 (1912).
- SCHUMM, O.: Über den Nachweis von Hämatin im menschlichen Blutserum. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **87**, 171 (1913).
- SCHWERD, W.: Eine neue Methode zum Nachweis von Hämatin im Blut. Medizinische **1958**, 383.
- ZETTERSTRÖM, R., R. STEMPPEL u. F. E. ESCARDÓ: Methemalbuminemia in the neonatal period with special reference to hemolytic disease of the newborn. Acta paediat. (Uppsala) **45**, 241 (1956).
- ZIFF, H. F.: Über die Wirkung von Plasma, Serum und Melanby-Thrombin auf die Hämoglobinbildung nach Hämolyse. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 225 (1946).