

3. zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung von Gewebsschnitten, was der Fettforschung, insbesondere der Arterioskleroseforschung dienlich sein kann und hat den besonderen Vorteil,

4. nicht nur die Art und Menge, sondern auch den Ort der Lipidablagerungen im Schnitt feststellen zu können. Nicht zuletzt sei

5. auch auf die Möglichkeit, andere Stoffe und Stoffgemische auf diese Art darzustellen, hingewiesen.

Literatur

- [1] HOLCZABEK, W.: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Lipidextrakten aus der menschlichen Lunge unter besonderer Berücksichtigung der Fettembolie. Vortrag auf der 42. Tagg. der Dtsch. Ges. für gerichtliche Medizin, München, 7.—10. 10. 1963; erschienen in: Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **55**, 242—246 (1964).
- [2] — Todesursachen bei frischen Thoraxverletzungen. Thoraxchirurgie **12**, 89—93 (1964).
- [3] — Zur Frage der Entstehung der Lungenfettembolie auf Grund dünn-schichtchromatographischer Untersuchungen. Klin. Med. (Wien) (im Druck).
- [4] MACHATA, G.: Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie. Mikrochim. Acta **1**, 79—86 (1960).
- [5] WOOD, P., K. IMAICHI, J. KNOWLES, G. MICHAELS, and L. KINSELL: The lipid composition of human plasma chylomikrons. J. Lipid Res. **2**, 225—231 (1964).
- [6] CURRI, S. B., M. RASO u. C. R. ROSSI: Die Anwendung der Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Fett und Lipoidsubstanzen in Gewebsschnitten. Histochemie **4**, 113—119 (1964).
- [7] BREITENECKER, L.: Persönliche Mitteilung.

Professor Dr. W. HOLCZABEK
Univ.-Inst. für gerichtliche Medizin
Wien IX, Sensengasse 2

HÄSSIG (Bern): Moderne serologische Methoden bei der gerichtlich-medizinischen Spurenuntersuchung. (Manuskript nicht eingegangen.)

U. HEIFER (Bonn): Zur Technik der Gc-Bestimmung.

HIRSCHFELDS Entdeckung der von ihm vorläufig als „gruppen-spezifische Komponenten“ bezeichneten α_2 -Globulin-Fractionen hat der forensischen Serologie eine wertvolle Erhöhung der Vaterschaftsausschlußchance ermöglicht. Das inzwischen vielfach überprüfte Untersuchungsverfahren stellt jedoch sowohl in technischer als auch in diagnostischer Hinsicht hohe Anforderungen an den Serologen, die in der Empfindlichkeit und Kompliziertheit einer kombinierten Technik von Agargelelektrophorese und Immunopräzipitation begründet sind. Zu Beginn unserer Gc-Untersuchungen, aber auch bei der Erweiterung

unserer bisherigen Ergebnisse, begegneten wir technischen und diagnostischen Problemen, die bei der forensischen Routineuntersuchung ständiger kritischer Berücksichtigung bedürfen.

Bei der Untersuchung von Normalseren fanden wir keine Fälle ohne Gc-Präcipitate. Die Typdiagnostik war in rund 10% der Fälle im ersten Untersuchungsgang nicht ausreichend sicher erreicht worden. In der Annahme, daß solche Mängel auf technische Untersuchungsfehler zurückzuführen seien, wurden die fraglichen Seren stets und z. T. mehrfach nachuntersucht. In knapp 2% aller Fälle konnte keine überzeugende Differenzierung erreicht werden.

Diese Beobachtungen rechtfertigen eine kurze Besprechung technischer und diagnostischer Fehlerquellen und einiger Hilfsmittel, deren man sich bei unzureichenden Untersuchungsergebnissen bedienen kann. Es erübrigt sich, an dieser Stelle die technischen Prinzipien des Verfahrens und seiner Modifikationen, wie sie von HIRSCHFELD, BUNDSCHUH, BAITSCH und verschiedenen anderen Nachuntersuchern eingehend beschrieben worden sind, auszuführen. Sowohl bei der Anwendung der HIRSCHFELDSchen Originalmethode als auch der Abwandlung nach BUNDSCHUH waren im gleichen Maße und in gegenseitiger Übereinstimmung zuverlässige Resultate erzielt worden. Objektträger- und Plattenpräparate lassen vergleichbar gute Auftrennungen der Probandenserren und klare Präcipitate mit dem von uns benutzten Anti-Gc-Serum des Pasteur-Institutes erkennen (Abb. 1 und 2).

Für die Typdifferenzierung haben sich uns einige Orientierungspunkte als nützlich erwiesen: Der Typ 1—1 beginnt mit einem Schnitt oder einer anodenwärts gelegenen Berührung des α_2 -Makroglobulins; er hat keine Berührung mit dem Transferrin und erstreckt sich als einfacher, kurzer Bogen bis in die Nähe des Albumins. Der Typ 2—2 beginnt in Transferrinnähe, verläuft in einfacher, kurzer Bogenform anodenwärts, das α_2 -Makroglobulin bogenförmig überspannend, über das er nicht wesentlich hinausläuft. Zwischen dem Anodenende des Bogens und der kathodennahen Begrenzung des Albumins besteht ein deutlicher Zwischenraum. Der 2—1-Typ nimmt entweder die Gesamtstrecke des 1—1 und 2—2 Präcipitates ein oder verläuft bei nicht ganz exakter technischer Darstellung im Mittelbereich beider Einzelstrecken. Er zeichnet sich als klarer oder angedeuteter, länger ausgezogener Doppelbogen oder auch als langgestrecktes, flaches Präcipitat ab. Das Gc-Präcipitat ist dasjenige, das im α_2 -Globulinbereich dem Antikörperkanal am nächsten gelegen ist.

Eine gleichmäßige, sorgfältigste Zubereitung der Agargelschicht auf möglichst geschliffenem Glasgrund ist unerlässlich. Gel- und Brückenpuffer müssen einen Gelspannungsabfall von 5 bis 7 Volt/cm gewährleisten. Die Elektrophoresedauer sollte mindestens 1,0 und höchstens

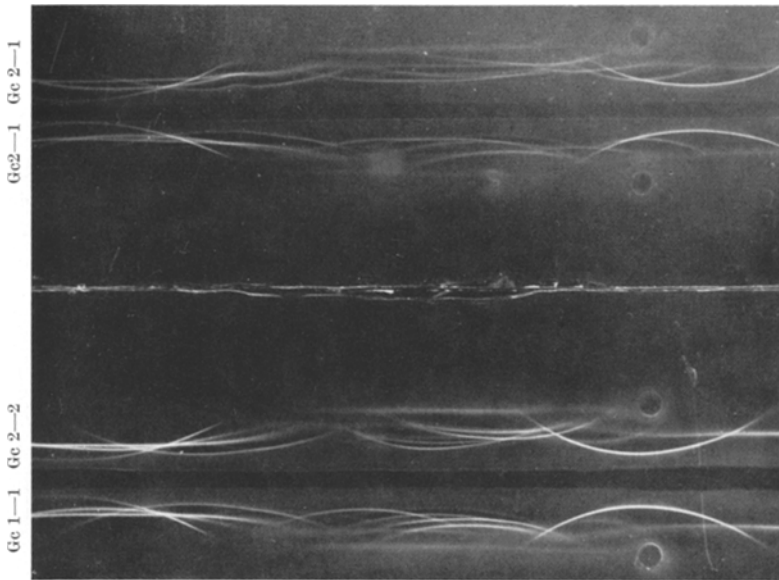


Abb. 1. Immunoelektrophoretische Darstellung der Gc-Typen nach der Hirschfeldschen Originalmethode

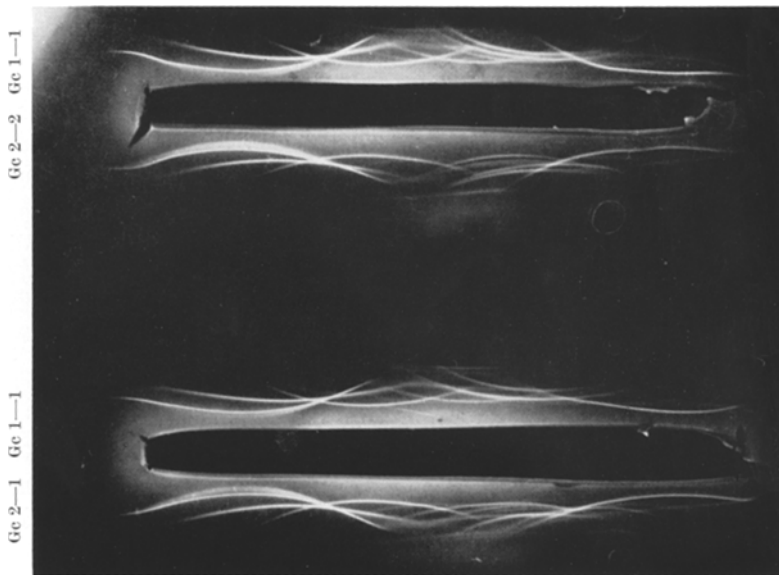


Abb. 2. Immunoelektrische Darstellung der Gc-Typen nach der technischen Modifikation von BUNDSCHUH

1,5 Std betragen. Mechanische und elektrophoretische Inhomogenität des Gels sind der exakten Präcipitatbildung abträglich; sie führen zu

mangelhafter Ausdehnung der Trennstrecke, zu ungenügender Abgrenzung der einzelnen Globulinfraktionen und zur Überlagerung von Präcipitaten in den einzelnen Fraktionen — also zu technischen Mängeln, die eine Typdiagnostik erschweren oder gar verhindern können.

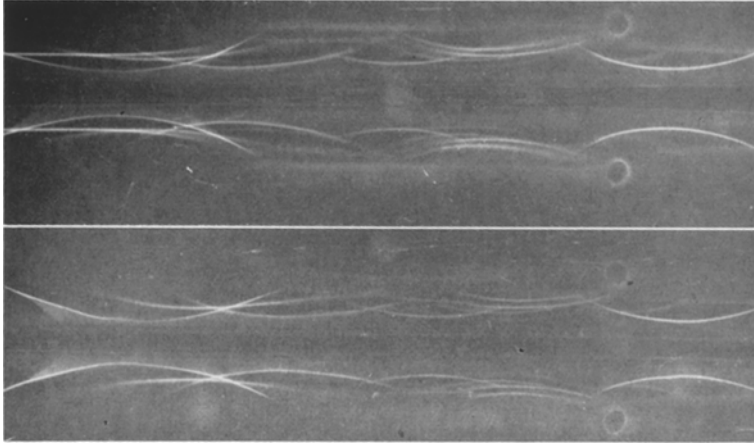


Abb. 3. Paralleluntersuchung eines Serums vom Typ 1—1. Exakte Regelmäßigkeit des Gc-Präcipitates in vier Versuchen

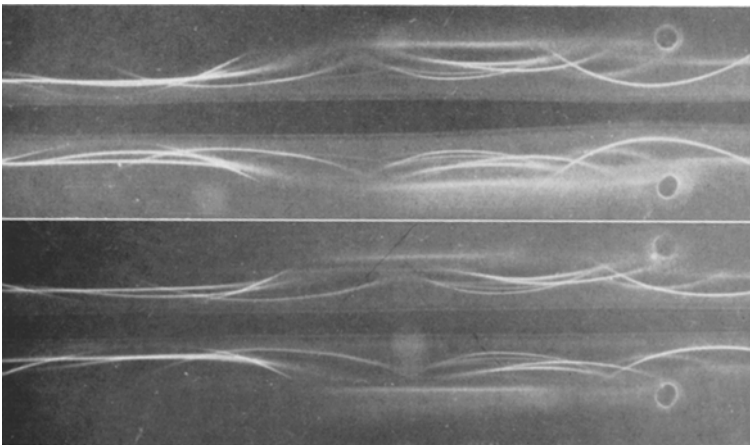


Abb. 4. Paralleluntersuchung eines Serums vom Typ Gc-2—2. Exakte Regelmäßigkeit des Gc-Präcipitates in vier Versuchen

Besonders ungünstig wirken sich solche Mängel auf die Differenzierung von Gc 1—1 und 2—1-Präcipitaten aus: bei der Erkennung des 2—2-Types hatten wir niemals Schwierigkeiten, auch wenn die Präparate technisch nicht ganz einwandfrei waren.

In Paralleluntersuchungen verschiedener Proben gleicher Seren zeigen sich in der Präcipitation von 1—1 und 2—2-Typen die größte Regel-

mäßigkeit und Exaktheit (Abb. 3 und 4). Unter gleichen Versuchsbedingungen kann das Gc 2—1-Präcipitat gewisse Formvariationen aufweisen. Diese deuten an, daß Schwierigkeiten bei der Unterscheidung der Typen 1—1 und 2—1 besonders für den noch ungeübten Untersucher möglich sind (Abb. 5).

Führten Mehrfachuntersuchungen nicht zu befriedigenden Differenzierungen, so hat sich uns der von HIRSCHFELD vorgeschlagene Verifikationstest als brauchbar erwiesen. Mischungen von 1—1 und 2—2-

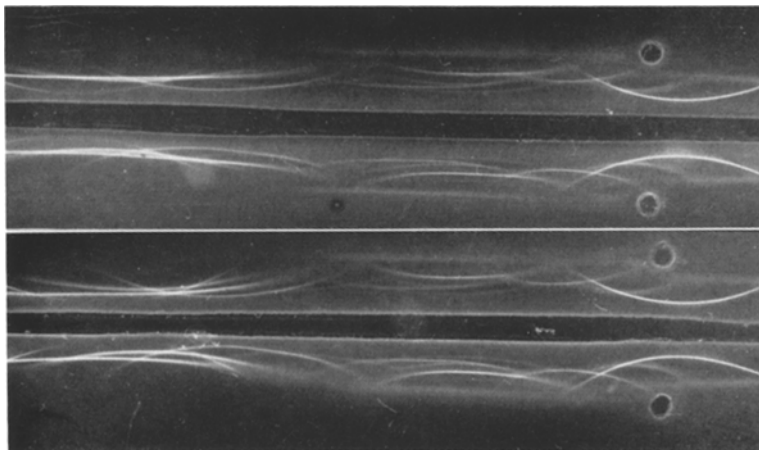


Abb. 5. Paralleluntersuchung eines Serums vom Typ 2—1. Technisch bedingte Formveränderungen des Gc-Präcipitates in vier Versuchen

Seren zu gleichen Anteilen führten zu langgestreckten 2—1-Präcipitaten (Abb. 6), während wir die von HIRSCHFELD angegebene unterschiedliche Betonung des 2—1-Präcipitates bei Mischungen von 2—1 mit 1—1 oder 2—2-Seren nicht überzeugend reproduzieren konnten.

Waren in den Probandenserum nur schwache Präcipitate zu erhalten, die Zweifel am Gc-Typ oder am Vorliegen des Gc-Präcipitates aufkommen ließen, bedienen wir uns mit Erfolg einerseits der Mehrfachuntersuchung, gegebenenfalls mit Anreicherung des Antikörperkanals durch erhöhte Zugabe von Testserum, und andererseits der Einengung des Probandenserums im Exsiccator. Durch Einengung oder auch vollkommene Eintrocknung und nur verminderte Aquadestzugabe zum getrockneten Probandenserum erzielten wir klare Präcipitate (Abb. 7). Diese Ergebnisse veranlassen uns, die von uns bisher noch nicht geübte Gc-Diagnostik in Blutspuren systematisch auf ihre Möglichkeiten zu prüfen.

Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit haben wir uns sowohl bei der Objektträger- als auch bei der Plattenmethode für eine ständige Benutzung eines Vergrößerungsgerätes entschieden. Es bietet uns bei

elfacher Vergrößerung der Präparate eine optimale Beurteilungsmöglichkeit. Die schematische Verwendung eines Typenrasters halten wir wegen möglicher Störungen der gesamten Trennstrecken und der Abgrenzung der einzelnen Globulinfraktionen gegeneinander nicht in allen Fällen für ausreichend sicher.

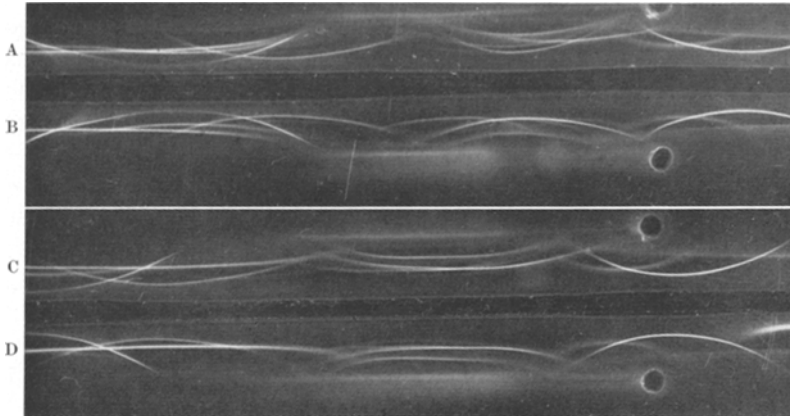


Abb. 6. Verifikationstest. A = Gc 2—2. B = Gc 1—1. C und D = Serummischung von A und B zu gleichen Teilen.

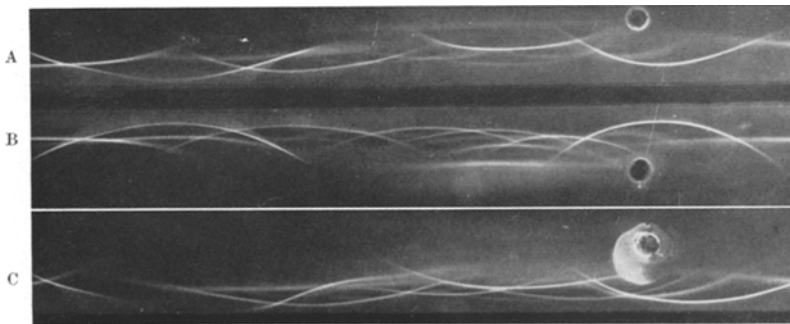


Abb. 7. Kontrolluntersuchung eines Serums mit schwachem Gc-1—1-Präcipitat. A = schwaches, unklares 1-1-Präcipitat. B = normales 1-1-Präcipitat. C = A nach Eintrocknung des Probandenserums und verminderter Zugabe von aqua dest.

Gemeinsam mit SCHREIBER durchgeführte Untersuchungen an 582 Seren von Patienten mit allergischen und parallerischen Erkrankungen primär chronischer Polyarthrit, Lebercirrhose, Geschlechtskrankheiten, malignen Tumoren der Haut und entzündlichen Dermatosen ergaben Verteilungszahlen, die der beobachteten Normalverteilung entsprechen, und nur in einem Falle von Psoriasis vulgaris offenbar zufällig ein atypisches Gc—2—1-Präcipitat. Auch bei deutlicher Vermehrung des alpha₂-Makroglobulingehaltes bei schweren chronischen Leberparenchymschäden konnten sichere Gc-Diagnosen gestellt werden. In den Seren

von primär-chronischen Polyarthritikern war indessen verschiedentlich eine Überlagerung des Gc-Präcipitates durch den Rheumafaktor (Vermehrung des beta₂-M-Globulins) zu beobachten. Die Gc-Diagnostik war jedoch auch in diesen Fällen zumindest nach Mehrfachuntersuchungen nicht ausgeschlossen.

BUNDSCHUH wies auf die günstige Darstellungsmöglichkeit der Gc-Typen im Nabelschnurblut hin. Nachdem wir sie bestätigt fanden, untersuchten wir bisher 177 Mutter-Kind-Paare klinisch und serologisch diagnostizierter Erythroblastosen. Ausnahmen von der Erbregel wurden nicht gefunden. In 15 Fällen (8,5%) konnte kein Gc-Präcipitat gefunden werden. Elfmal lag ein extrem hoher alpha-Titer, zweimal ein beta-Titer, zweimal ein Anti-D-Titer vor. Außerdem wurden in drei weiteren Fällen, in denen irreguläre Antikörper in NaCl und Gelatine nicht nachgewiesen wurden, keine Gc-Präcipitate erkannt. Diese Ergebnisse lassen daran denken, daß bei den untersuchten neugeborenen Erythroblastosekindern Immunglobulinreifungsstörungen oder -mangelzustände vorliegen können, die durch eine Verminderung des alpha₂- und beta-Globulingehaltes charakterisiert sind. Wir fanden in solchen Seren sowohl eine Abschwächung als auch eine zahlenmäßige Verminderung der Präcipitate im alpha₂- und beta-Globulinbereich.

Bisher konnten wir 2248 Seren nicht verwandter Probanden der Gc-Diagnostik unterziehen und fanden folgende Verteilung der drei Typen:

Tabelle 1. Verteilung der Gc-Typen im eigenen Untersuchungsmaterial

Phänotyp	n	%
1—1	1168	51,96
2—1	900	40,04
2—2	180	8,00
n	2248	100,00

Aus diesen Ergebnissen sind eine Genfrequenz für Gc¹ von 0,720 und für Gc² von 0,280 und eine theoretische Ausschlußchance von 16,10% für Nichtväter abzuleiten, die mit unseren ersten Resultaten (n = 639, Gc¹ = 0,7136, Gc² = 0,2864, W = 16,26%) gut übereinstimmen.

Überprüfungen des angenommenen kombinanten Erbganges zeigten keine Abweichungen von der Regel bei 258 Mutter-Kind-Paaren.

Tabelle 2. Verteilung der Gc-Typen bei 258 Mutter-Kind-Paaren

Mütter Phänotyp	Kinder			Summe
	1—1	2—1	2—2	
1—1	82	35		117
2—1	43	63	20	126
2—2		11	4	15
Summe	125	109	24	258

Zusammenfassung

Gc-Untersuchungen an 2248 Seren nicht verwandter Probanden ergaben eine Genfrequenz für Gc¹ von 0,720 und für Gc² von 0,280. Die theoretische Ausschlußchance für Nichtväter beträgt dementsprechend 16,10%. Überprüfungen des kombinanten Erbganges an 258 Mutter-Kind-Paaren und 177 Mutter-Kind-Paaren klinisch und serologisch gesicherter Neugeborenen-Erythroblastosen zeigten keine Regelabweichungen. An 582 Seren von Patienten verschiedener Krankheitsgruppen wurden keine Verteilungs-, nur in einem Falle Formabweichungen des Gc-Types gefunden. 18 Neugeborenen-Seren ließen kein Gc-Präzipitat erkennen. Es werden technische Verfahrensmängel mit ihren möglichen Auswirkungen auf die Sicherheit der Typdiagnostik untersucht und Orientierungspunkte für die Typenbestimmung angegeben. Verifikationstest und Serumreinigung haben sich bei der Differenzierung nicht eindeutiger Gc-Präcipitate bewährt.

Literatur

- BAITSCH, H., J. KLOSE, K. OMOTO u. H. RITTER: Zur Technik der Immuno-electrophorese — eine für große Reihenuntersuchungen geeignete Variante der Mikromethode. *Ärztl. Lab.* **10**, 42—47 (1964).
- BUNDSCHUH, G., Z. MAREK u. G. GESERICK: Untersuchungen über die Anwendbarkeit der menschlichen Gc-Komponenten in der forensischen Serologie. *Ärztl. Lab.* **9**, 181—193 (1963).
- HEIFER, U.: Untersuchungen über die gruppenspezifischen Komponenten (Gc) von HIRSCHFELD. *Münch. med. Wschr.* Nr. **3**, 108—110 (1964).
- HIRSCHFELD, J.: Immuno-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the hypoglobulin. *Acta path. microbiol. scand.* **47**, 160 (1959).
- Shape of the precipitate in immuno-electrophoresis. *Nature (Lond.)* **185**, No 4707, 164 (1960).
- Immuno-electrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera. *Sci. Tools* **2**, 18 (1960).
- The use of immuno-electrophoresis in the analysis of normal sera and in studies of the inheritance of certain serum protein. *Sci. Tools* **3**, 17 (1962).
- The Gc-system. Immuno-electrophoretic studies of normal human serum with special reference to a new genetically determined serum system (Gc.). *Pogr. Allergy* **6**, 155 (1962).
- , and L. BECKMANN: A new group-specific serum system (Gc-groups) in relation to blood and serum groups. *Acta gene. (Basel)* **10**, 48 (1960).
- , and A. HEIKEN: Application of the Gc-system in paternity cases. *Amer. J. hum. Genet.* **1**, 19 (1963).
- B. JONSSON, and M. RASMUSON: Inheritance of a new group-specific-system demonstrated in normal human sera by means of an immuno-electrophoretic technique. *Nature (Lond.)* **185**, No 4717, 931 (1960).
- KORINEK, J. u. M. KOUT: Beitrag zum Nachweis der Gc-gruppenspezifischen Komponente in menschlichen Seren. *Z. Immun.- u. Allergieforsch.* **125**, 191—198 (1963).

- MAREK, Z., G. BUNDSCHUH, CH. KERDE u. G. GESERICK: Untersuchungen über die Anwendbarkeit der menschlichen Gc-Komponenten in der forensischen Serologie. *Ärztl. Lab.* **9**, 228—233 (1963).
- SCHLESINGER, D., A. VOGT u. O. PROKOP: Die Methodik der Gc-Bestimmung. *Öff. Gesundh.-Dienst* **8**, 332 (1963).
- SCHREIBER, F. P.: Untersuchungen über die gruppenspezifischen Komponente (Gc) des Serumeiweißes in verschiedenen Krankheitsgruppen. Diss. Bonn, 1964.
- Weitere Literaturangaben siehe U. HEIFER, 1964.

Dr. med. Ulrich HEIFER
 Institut für Gerichtliche Medizin
 der Universität Bonn

G. RADAM (Berlin): Zur Bedeutung und Bestimmungstechnik erblicher Pseudocholinesterase-Varianten.

Allgemeines

Die Fermentforschung hatte in den letzten Jahren die Entdeckung einer Reihe genetisch gesteuerter, im menschlichen Blut enthaltener Enzymvarianten zu verzeichnen. Dadurch wurde nicht nur in wichtigen klinischen, pharmakologischen und toxikologischen Fragen Klärung erzielt, sondern vor allem auch die Zahl der Blut- und Serumgruppen um mehrere, mit biochemischen Methoden exakt faßbare Merkmalssysteme erweitert. Für den Gerichtsmediziner und Serologen haben sich neben den hier zu besprechenden Cholinesterasen erbliche Varianten der in den Erythrocyten enthaltenen sauren Phosphatase als interessant erwiesen. Die Phosphatasegruppen wurden erst kürzlich von englischen Autoren entdeckt (HOPKINSON, SPENCER und HARRIS).

Das Schrifttum über die Cholinesterase bietet außer einer Fülle sehr aufschlußreicher Arbeiten auch solche, die im wesentlichen bekannte Zusammenhänge in mehr oder weniger ausführlicher Form wiederholen. Angesichts dieser Tatsache und mit Rücksicht auf das Thema dürfen wir uns damit begnügen, theoretische Erörterungen kurz abzuhandeln. Dafür soll der Darstellung untersuchungstechnischer Einzelheiten mehr Raum gegeben werden. Letzteres deshalb, weil Literaturangaben hierzu zwar gewisse Standardbedingungen enthalten, dem Praktiker dienliche methodische Einzelheiten aber vermissen lassen.

Seitens der gerichtlichen Medizin wurde der Cholinesterase besonders in den fünfziger Jahren im Zusammenhang mit den damals häufig beobachteten Vergiftungen durch Phosphorsäureester größere Beachtung geschenkt. Hebt man als ein Charakteristikum der Pseudocholinesterase-Varianten deren unterschiedliche Empfindlichkeit gegen bestimmte, noch zu besprechende Inhibitoren hervor, so ist bemerkenswert, daß nach Untersuchungen von KALOW und DAVIES (1958) organische