

- 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

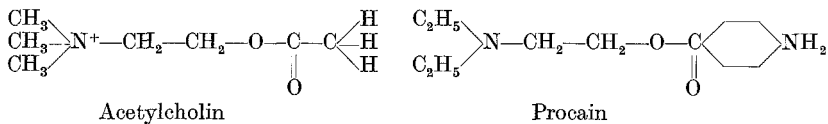
Die Fermentforschung hatte in den letzten Jahren die Entdeckung einer Reihe genetisch gesteuerter, im menschlichen Blut enthaltener Enzymvarianten zu verzeichnen. Dadurch wurde nicht nur in wichtigen klinischen, pharmakologischen und toxikologischen Fragen Klärung erzielt, sondern vor allem auch die 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

Phosphate keine Unterschiede in der Hemmwirkung zeigen. Erklärend wird darauf hingewiesen, daß sie lediglich mit der esteratischen Haftstelle des Ferments reagieren (NACHMANSOHN und WILSON 1951) und geschlußfolgert, daß normale und atypische Esterase in der Struktur ihrer esteratischen Haftstellen demzufolge übereinstimmen müssen. Hemmstoffe, gegen die sich die Fermenttypen unterschiedlich verhalten, reagieren wahrscheinlich entweder nur mit der anionischen Haftstelle oder mit beiden. Demnach wäre das differierende Verhalten dieser Typen auf einen ungleichen Bau im anionischen Teil zurückzuführen (KALOW und DAVIES).

Zu den Inhibitoren letzterer Art gehören neben vielen anderen auch die meisten Lokalanästhetica und Succinylcholin. Wesentliche Eigenschaft der atypischen Esterase ist es, zu solchen Hemmstoffen erheblich geringere Affinität zu besitzen, als der normale Fermenttyp. Auf diesem Phänomen beruht die Bestimmungsmethode. Wird der betreffende Stoff im Organismus von der Serumesterase abgebaut, so vollzieht sich die Spaltung bei Trägern atypischen Ferments aus dem gleichen Grund mit deutlich herabgesetzter Geschwindigkeit. Dies kann von merklichem Einfluß auf die Toxizität oder Wirkungsdauer eines Mittels sein. Es wäre beispielsweise denkbar, daß bei größeren Procaingaben der Pseudocholinesterasetyp des Patienten nicht gleichgültig ist. Von besonderem Interesse ist, daß der Abbau der Lokalanästhetica, vor allem des Procains, durch die Serumcholinesterase erst im Jahre 1952 von KALOW bewiesen werden konnte. Zuvor hatte man an die Existenz einer „Procainesterase“ geglaubt. Wie ein Vergleich der chemischen Formeln lehrt, findet dieser Beweis in der Ähnlichkeit zwischen dem physiologischen Substrat und Procain eine große Stütze:



Klinisch und toxikologisch besonders wichtig ist die Kenntnis des Pseudocholinesterasetyps von Patienten, bei denen eine Muskelrelaxation mit Succinylcholin durchgeführt werden soll. Dieses Relaxans unterliegt dem raschen Abbau durch die Serumesterase und wirkt bekanntlich bei einmaliger Injektion nur wenige Minuten. Da jedoch das Pharmakon von der atypischen Enzymvariante nur sehr langsam abgebaut wird, kann die Wirkung bei entsprechenden Personen infolge ungewöhnlich starker Anhäufung des Depolarisators an der motorischen Endplatte bis auf mehrere Stunden verlängert sein. KALOW (1962) demonstriert an Hand einer graphischen Darstellung, daß Träger rein atypischer Esterase (Homozygote) am stärksten gefährdet

sind; aber auch Mischtypen und solche Patienten, die zwar dem Normaltyp zugehören und dabei einen erniedrigten Fermentpiegel haben, müssen mit verlängerter Wirkung rechnen. Wie weiter unten gezeigt wird, kann auch der Mangel oder völliges Fehlen aktiver Pseudocholinesterase genetisch bedingt sein. Nach dem Gesagten leuchtet ein, daß ein Patient, dessen atypische Enzymvariante man erst an der abnormen Reaktion auf Succinylcholin erkennt, allen Gefahren ausgesetzt ist, die mit einer viele Stunden dauernden künstlichen Beatmung und Intubation verbunden sind; KALOW weist in seiner Monographie in diesem Zusammenhang insbesondere auf mögliche hypoxämische Schädigungen des Hirngewebes hin. Entscheidend ist bei alledem wohl, daß sich der Pseudocholinestertyp vorher zuverlässig bestimmen läßt und es sich hier deshalb um eine vermeidbare Gefahr und Belastung handelt. Daher gibt es auch keinen Einwand gegen eine prophylaktische Enzymuntersuchung, der als stichhaltiges Gegenargument Anerkennung finden könnte.

Atypische Pseudocholinesterase-Varianten, besonders der heute am gründlichsten untersuchte, vom Gen *d* gesteuerte Typ, können als Merkmale mit gesichertem Erbgang zu Vaterschaftsbegutachtungen ergänzend herangezogen werden. Allerdings erreicht die Ausschlußchance, durch die Seltenheit atypischer Formen bedingt, kaum 2%, so daß wohl nur in jenen Fällen eine Untersuchung lohnt, die in anderen Systemen keinen Ausschluß geben.

Neuerdings ist die Serumcholinesterase auch von spurenkundlichem Interesse. SAMICO u. Mitarb. (1962) konnten nämlich zeigen, daß sich die Eigenschaft der Esterase, bei der Stärkegelelektrophorese ein spezifisches Auftrennungsbild zu geben, zur Bestimmung der Artzugehörigkeit von Blutspuren einsetzen läßt. Ob das einen echten Fortschritt gegenüber der Uhlenhuthschen Präcipitationsreaktion darstellt, vermögen wir zur Zeit noch nicht auszusagen.

Genetik

Im Jahre 1957 gelang KALOW und STARON die Entdeckung genetischer Ursachen der verlängerten Succinylcholinwirkung. Unter Zuhilfenahme einer neuartigen Bestimmungsmethode für die Esteraseaktivität entwickelten sie einen Hemmtest, dessen Anwendung zur Entdeckung von 3 Phänotypen der Serumcholinesterase führte. Sie ließen unter Standardbedingungen *in vitro* das Lokalanästhetikum Dibucain auf das Ferment einwirken und fanden eine dreigipflige Verteilung der Aktivitätsminderung, indem bei etwa 97% der Versuchspersonen eine Hemmung um etwa 80%, bei den übrigen um ca. 60% und in äußerst seltenen Fällen um annähernd 16% zu verzeichnen war. Als Maß der relativen Hemmbarkeit wurde das Symbol „DN“ (dibucaine number)

eingeführt. Auf Grund von Familienuntersuchungen gelangte man zur Annahme zweier alleler Gene ohne Dominanz. Eines der beiden Gene steuert die Enzymvariante hoher Empfindlichkeit gegen den Hemmstoff und bewirkt bei Homozygoten eine hohe Dibucainzahl (Genotyp D/D)¹. Das andere Gen steuert bei Homozygoten eine Esterase mit niedriger Dibucainzahl und wird als atypisch bezeichnet (Genotyp d/d). Personen mit mittleren Dibucainzahlen gehören zu den Heterozygoten (Genotyp D/d); ihre Esterase stellt eine Mischung beider homozygoter Formen dar (KALOW 1962). Von LIDDELL u. Mitarb. (1962) durchgeführte papierelektrophoretische und säulenchromatographische Auftrennungen haben jeden Zweifel hierüber beseitigt. Die Bestimmung von Pseudocholinesterase-Varianten in Geweben, z. B. in der Leber, im Pankreas und Gehirn, ist möglich (KALOW).

Spätere Beobachtungen anderer Autoren (HARRIS und WHITTAKER 1962) ergaben, daß bestimmte Abweichungen von beobachteten Relationen zwischen den Dibucainzahlen innerhalb einiger Familien mit Hilfe der Zwei-Gen-Theorie allein nicht erklärt werden konnten. So gingen z. B. aus einer Elternpaarung mit $DN = 80$ (D/D) und $DN = 54$ (D/d) scheinbar D/D -Kinder mit Dibucainzahlen von 73; 75; 76 hervor, obwohl für diesen Genotyp DN -Werte um 80 zu erwarten gewesen wären. Ein weiteres Kind hatte ein DN von 65 (D/d). Da sowohl der DN -Wert von 54 für den Genotyp D/d als auch die DN -Werte von 73; 75 und 76 für den Genotyp D/D unerwartet niedrig lagen, war die Wirkung eines dritten allelen Gens sehr wahrscheinlich. Erst die Einführung des Natriumfluorids als Hemmstoff brachte einen entscheidenden Fortschritt. NaF ergibt wie das Dibucain gleichfalls eine Verteilungskurve mit 3 Maxima (lediglich mit anderen Zahlen; D/D -Typen werden um ca. 60%, d/d -Typen um ca. 25% und D/d -Typen um etwa 45% inhibiert). Bereits im Jahre 1961 veröffentlichten HARRIS und WHITTAKER die Entdeckung zweier neuer Phänotypen. Letztere zeichnen sich durch diskordantes Verhalten gegen die beiden Hemmer aus, indem sich der eine gegen Dibucain wie ein D/D -Typ mit leicht erniedrigter Dibucainzahl, gegen Fluorid jedoch wie ein D/d -Typ verhält, während der andere auf Dibucain und Fluorid wie eine D/d -Variante mit unerwartet niedriger Dibucain- und Fluoridzahl reagiert. Das entdeckte Gen mußte auch in der erwähnten Familie vorkommen (es wurde von uns als D' bezeichnet): Der heterozygote Elternteil ($DN = 54$) stellte sich als D'/d -Typ heraus und hatte die Information D' auf 3 Kinder übertragen (Genotypen D/D'), wogegen das vierte das d erhielt (Genotyp D/d). Beim Studium der Literatur fällt auf, daß ähnliche Abweichungen innerhalb einiger Sippen schon von KALOW und STARON (1957) bemerkt wor-

¹ Die Symbole D ; D' ; d wurden wegen ihrer Einfachheit anderen, sonst üblichen Symbolen vorgezogen.

den waren, ohne daß ihnen eine Klärung gelang. In einer fünfköpfigen Familie hatten sich folgende DN-Werte ergeben: Vater 64,0 — Mutter 77,9 — Sohn 65,8 — eineiige Zwillingssöhne 44,7 bzw. 48,1. Geht man von der Annahme aus, daß der Vater dem D/d -Typ zugehört und ordnet der Mutter den Genotyp D/D' zu, so kann der einzelne Sohn sehr wohl den Typ D/d besitzen, und die Esterase der Zwillinge wäre als D'/d -Typ aufzufassen.

Auch das völlige Fehlen aktiver Serumcholinesterase kann genetisch bedingt sein (LIDDELL u. Mitarb. 1962). Solche Fälle werden naturgemäß durch hochgradig verlängerte Succinylcholinwirkung (bis zu 9 Std) offenbar. Als Ursache wird ein viertes Allel diskutiert. Einen interessanten Fall hierzu teilten GOEDDE u. Mitarb. (1963) mit: Ein Mann, der auf Succinylcholin mit einer Apnoe von 7 bis 8 Std reagierte, wurde zunächst als d/d -Typ identifiziert. Unter dieser Annahme hätte er jedem seiner Nachkommen ein Gen d vererben müssen. Da aber eine seiner Töchter dem Typ D/D zuzugehören schien, wurde das Vorliegen des Genotyps $d/-$ beim Vater und des Typs $D/-$ bei der Tochter angenommen. Es lassen sich an Hand des Hemmtestes weder D/D von $D/-$ noch d/d von $d/-$ unterscheiden, Aufschlüsse sind nur durch Familienuntersuchungen zu erhalten. Entsprechend dem Dosisseffekt ist die Esteraseaktivität bei heterozygoten Trägern des silent gene vermindert, bei Homozygoten aufgehoben.

Von 10 möglichen Kombinationen der 4 Gene konnten bisher die Genotypen $D'/-$ und D'/D' nicht aufgefunden werden; obwohl GOEDDE u. Mitarb. (1963) in einer Tabelle den zuletzt genannten Typ mit DN = 66 und FN = 35 („Mittelwerte aus der Literatur und eigenen Versuchen“) eindeutig charakterisieren, fehlt in der Literatur ein entsprechender Hinweis auf die Beobachtung dieses Typs. Sicher handelt es sich demnach um hypothetische Zahlenangaben. Die gleiche Arbeit enthält eine Zusammenstellung der bisher untersuchten Populationen (Kanada, England, Südwestdeutschland, Griechenland, Tschechoslowakei, Portugal, Marokko, Berber). Als Gesamthäufigkeit der Heterozygoten ergab sich 3,7%, wobei uns die Errechnung des Mittelwertes aus dem sehr unterschiedlichen und teilweise sehr dürftigen Zahlenmaterial bedenklich zu sein scheint. Die bisher umfangreichsten Untersuchungen haben KALOW und GUNN (1959) in Kanada durchgeführt. An 2017 Personen ermittelten sie für D/d -Typen eine Frequenz von $3,8 \pm 0,4\%$, für d/d -Genotypen eine Häufigkeit von 1:2290 bis 1:3650. In Südwestdeutschland kommen D/d -Varianten zu 2,9% vor (GOEDDE u. Mitarb. 1963). Nach SZEINBERG u. Mitarb. (1963) beläuft sich die Frequenz der Heterozygoten in der jüdischen Bevölkerung (D/d) auf etwa 6,3%.

Von einer weiteren erblichen Variante berichten HARRIS u. Mitarb. (1963). Sie ist mittels Stärkegelelektrophorese nachzuweisen und wird offenbar unabhängig von anderen Typen vererbt. In der englischen

Bevölkerung kommt sie zu 5% und unter Bewohnern der Insel Tristan da Cunha zu 17% vor.

Untersuchungstechnik

Prinzip

Grundlage bildet das von KALOW u. Mitarb. (1956) angegebene Verfahren zur Bestimmung der Pseudocholinesterase-Aktivität. Als Substrat dient Benzoylcholinchlorid, das im UV-Bereich (240 nm) ein Absorptionsmaximum hat und daher ohne den Umweg über eine Farb-reaktion direkt quantitativ erfaßt werden kann. Enzym und Substrat liegen in hoher Verdünnung vor. Die Aktivitätsbestimmung dauert nur wenige Minuten und geschieht bei Zimmertemperatur in einem UV-Spektrofotometer. Die Quarzküvette ist gleichzeitig Reaktionsgefäß. Jede DN-Bestimmung erfordert demnach 2 Ansätze: einen mit und einen weiteren ohne Hemmstoff. Als Inhibitor findet Dibucain (Percain) Verwendung, das sofort nach Zugabe zum Serum vollen Hemmeffekt zeigt. Wird ein Einstrahlphotometer benutzt, so entfällt der Leerwert, weil lediglich die Extinktionsänderung in einer bestimmten Zeit interessiert.

Standardbedingungen

Lösungsmittel: m/15 Phosphatpuffer pH = 7,38

Substrat: $5 \cdot 10^{-5}$ m Benzoylcholinchlorid

Hemmstoffe: 10^{-5} m Dibucainhydrochlorid und $5 \cdot 10^{-5}$ m NaF

Reaktionstemperatur: 26° C

Reaktionszeit: 3 min

Serumkonzentration: 1 : 200

Meßwellenlänge: 240 nm

Schichtdicke: 1 cm

Herstellung der Lösungen

1. 9,955 g prim. Kaliumphosphat (KH_2PO_4) + 105,05 g sek. Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) zu 1000 ml aqua dest. lösen. Dieser Ansatz dient als Vorratslösung.

2. 41,7 mg Dibucainhydrochlorid werden zu 100 ml aqua dest. gelöst. Die Lösung ist haltbar.

3. 23,1 mg Natriumfluorid sind in 100 ml aqua dest. zu lösen. Aufbewahrung in einer Polyäthylenflasche!

4. 13,4 mg Benzoylcholinchlorid in 100 ml aqua dest. lösen. Die Lösung ist im Kühlschrank aufzubewahren und bleibt so mindestens 2 Wochen verwendbar.

5. Bei Bedarf werden 200 ml der Vorratslösung 1 mit aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. (Konzentration: 1,1 · m/15).

6. Zur Herstellung des Dibucain-Puffer-Gemisches werden zu 200 ml der Vorratslösung 1 10 ml der Lösung 2 gegeben. Auffüllen auf 1000 ml mit aqua dest.

7. Zur Herstellung des Fluorid-Puffer-Gemisches werden zu 200 ml der Lösung 1 10 ml der Lösung 3 gegeben. Auffüllen mit aqua dest. auf 1000 ml. Aufbewahrung in einer Polyäthylenflasche!

8. Unmittelbar vor Gebrauch setzt man 100 ml der Lösungen 5 bis 7 jeweils 10 ml der Lösung 4 zu, so daß 3 Ansätze zu je 110 ml entstehen, die nunmehr $5 \cdot 10^{-5}$ m Benzoylcholin in m/15 Phosphatpuffer enthalten. Ansatz 6 enthält außerdem 10^{-5} m Dibucain und Ansatz 7 neben dem Substrat $5 \cdot 10^{-5}$ m NaF. Mit 110 ml Lösung lassen sich etwa 25 Bestimmungen ausführen.

Temperaturmessung

Die Temperatur ist von großem Einfluß auf den Fehler des Meßergebnisses. Zu ihrer Stabilisierung bedarf es eines thermostatisierten Küvettenhalters und eines Temperatenausgleiches aller Lösungen. Aber auch dann sind die Bedingungen keineswegs ideal, weil nach Zugabe des Serums zum Substrat sofort mit dem Messen begonnen werden muß und deshalb ein Temperatenausgleich im Fotometer nicht mehr abgewartet werden kann. Es wäre deshalb günstig, wenn die Möglichkeit bestünde, von einer abweichenden auf die geforderte Temperatur umzurechnen. KALOW u. Mitarb. geben eine Formel an, die diese Korrektur erlaubt:

$$\text{antilog } 0,0283 (26^{\circ} - T^{\circ}) = \frac{\Delta E_{II}}{\Delta E_{I}} \text{ wobei } T = 20 \dots 26^{\circ} \text{ C}$$

Man erhält einen Faktor, mit dem das bei der Temperatur T erhaltene Ergebnis zu berichtigen ist. Wir haben zur Arbeitserleichterung eine Korrekturtabelle berechnet:

Tabelle 1. Faktoren zur Berichtigung des Temperaturfehlers

T	f	T	f	T	f	T	f
25,9	1,006	24,4	1,110	22,9	1,224	21,4	1,350
25,8	1,013	24,3	1,117	22,8	1,232	21,3	1,358
25,7	1,020	24,2	1,125	22,7	1,240	21,2	1,367
25,6	1,026	24,1	1,132	22,6	1,248	21,1	1,376
25,5	1,033	24,0	1,139	22,5	1,256	21,0	1,385
25,4	1,040	23,9	1,147	22,4	1,265	20,9	1,394
25,3	1,047	23,8	1,154	22,3	1,273	20,8	1,403
25,2	1,053	23,7	1,162	22,2	1,281	20,7	1,413
25,1	1,060	23,6	1,169	22,1	1,290	20,6	1,422
25,0	1,067	23,5	1,177	22,0	1,298	20,5	1,431
24,9	1,074	23,4	1,185	21,9	1,306	20,4	1,440
24,8	1,082	23,3	1,192	21,8	1,315	20,3	1,450
24,7	1,088	23,2	1,200	21,7	1,324	20,2	1,459
24,6	1,095	23,1	1,208	21,6	1,332	20,1	1,469
24,5	1,103	23,0	1,216	21,5	1,341	20,0	1,478

Wie wir feststellen konnten, läßt sich die Formel nicht nur auf die ungehemmte Reaktion, sondern gleichfalls auf die bei Dibucainhemmung erhaltenen Werte anwenden, weil die Dibucainhemmung im genannten Temperaturbereich nahezu temperaturunabhängig ist. Die Fluoridhemmung zeigt dagegen eine erhebliche Temperaturabhängigkeit, so daß auf jeden Fall bei vorgeschriebener, konstanter Temperatur gearbeitet werden muß. Mit steigender Temperatur fallen die Fluoridzahlen ab; die Zuordnung zum falschen Genotyp kann die Folge sein.

Zur Temperaturmessung kleiner Flüssigkeitsmengen (4 ml) bedarf es eines entsprechend dimensionierten Thermometers mit kurzer Ansprechzeit. Wir bauten deshalb ein kleines, batteriegespeistes Thermometer mit einem Temperatugeber, der aus zwei 0,5 mm großen Zwergthermistoren (je 1 Kiloohm) besteht. Die Thermistoren wurden auf ein Plastikröhrchen montiert und in Brückenschaltung angeordnet (Abb. 1). Die Ablesung erfolgt auf einem $50 \mu\text{A}$ -Meßinstrument mit einer Genauigkeit von $0,1^\circ \text{C}$. Das Thermometer ist für jeden beliebigen Temperaturbereich eichbar.

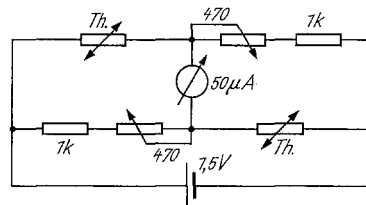


Abb. 1. Schaltung des elektrischen Thermometers

Ermittlung der Dibucainzahl

Für die Untersuchungen steht uns ein Zeiss-Universalspektrofotometer VSU 1 (Einstrahlensystem) zur Verfügung. Wir bestimmen zur Zeit nur die uns besonders interessierenden Dibucainzahlen. Es wird auf eine Temperaturstabilisierung verzichtet und bei der gerade herrschenden Raumtemperatur ($20\text{--}26^\circ$) gearbeitet. Die Technik ist einfach: Eine Quarzküvette wird mit 4 ml der oben angegebenen Puffer-Substratlösung beschickt. Dann wird aus einer Kapillarpipette (geeichte Hb-Pipette) 0,02 ml Serum zugegeben. Pipette durch mehrfaches Aufziehen der Lösung gründlich entleeren! Der Inhalt der Küvette ist anschließend durch Kippen des abgedeckten Gefäßes zu durchmischen. Innerhalb der ersten Minute nach Serumzugabe muß mit der Messung begonnen werden! Es gelingt ohne weiteres, die Küvette innerhalb von 45 sec in den Strahlengang zu bringen. Man stellt vor jeder Messung das Meßpotentiometer zweckmäßig auf einen festgelegten Wert, z. B. $E = 0,5$, ein und regelt mit dem Leerwertregler das Nullinstrument auf Spannungslosigkeit (Mittelstellung) ein. Ist das geschehen, so wird nach Stoppuhr die Extinktionsabnahme innerhalb 3 min bestimmt; sie kann durch Nachstellen des Meßpotentiometers sofort abgelesen werden. Während des Reaktionsablaufes nimmt man die Temperaturmessung in

der Kuvette vor. Genauso ist mit einem inzwischen vorbereiteten zweiten Ansatz, der Dibucain enthält, zu verfahren.

Zur Kontrolle der Versuchsanordnung nahmen wir eine Extinktions-Zeit-Kurve auf (vgl. Abb. 2). Aus ihr ist abzulesen, daß die Spaltung von Benzoylcholin innerhalb der ersten 7 min nach Serumzusatz linear abläuft (verwertbare Meßzeit) und die Extinktionsänderung (ΔE) den

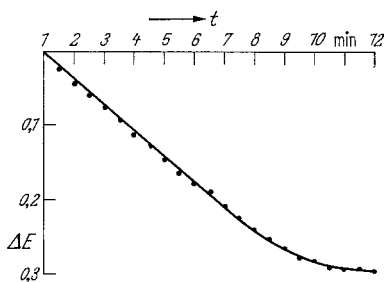


Abb. 2. Verlauf der Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit

Wert 0,2 nicht überschreiten darf. Höhere Aktivitäten werden auch kaum gemessen.

Die Dibucainzahl errechnet sich aus den Meßwerten nach der Formel:

$$\text{DN} = 100 \left(1 - \frac{\Delta E_2}{\Delta E_1} \right) \quad \left\{ \begin{array}{l} \Delta E_2 = \text{Extinktionsänderung mit} \\ \text{Dibucain} \\ \Delta E_1 = \text{Extinktionsänderung ohne} \\ \text{Dibucain}^1 \end{array} \right.$$

Tabelle 2 gibt die Dibucain- und Fluoridzahlen der Genotypen wieder:

Tabelle 2. (Nach KALOW).

Genotyp	DN	FN
<i>D/D</i>	80 (77—83)	61 (55—68)
<i>D/d</i>	62 (54—70)	48 (39—57)
<i>d/d</i>	22 (19—25)	23 (19—28)
<i>D/D'</i>	(73—78)	(50—55)
<i>d/D'</i>	(52—54)	(26—34)

Einige Untersuchungsergebnisse

Unsere populationsgenetischen Untersuchungen erfassen den nord- und mitteldeutschen Raum. In Abb. 3 haben wir die Verteilung der Dibucainzahlen von 714 Individuen graphisch dargestellt. In dieser

¹ ΔE_1 kann als direktes Maß der Pseudocholinesterase-Aktivität verwendet werden. Der Fehler liegt für ΔE bei 3% und für DN bei etwa 2.

Gruppe fanden sich 16 Personen, die dem Genotyp D/d zuzuordnen waren (2,2%). In einem Teil der Fälle konnten zur Bestätigung die Familien untersucht werden. Der bei 20 eingetragene Wert (d/d oder $d/—$) wurde nicht zufällig aufgefunden, sondern bei einer Frau bestimmt, die während einer Operation auf Succinylcholin mit einer über 3 Std anhaltenden

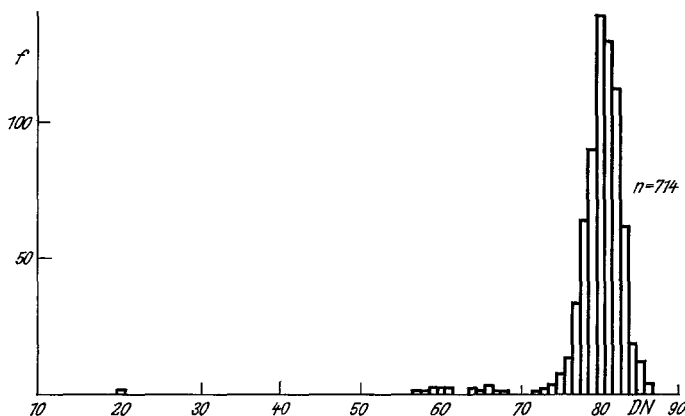


Abb. 3. Dibucainzahlen der Bevölkerung im nord- und mitteldeutschen Raum

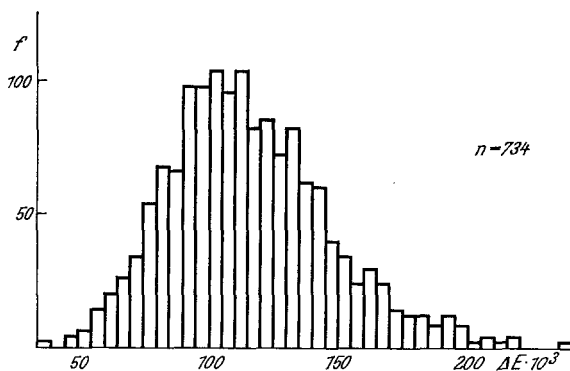


Abb. 4. Verteilung der gemessenen Esteraseaktivitäten

Apnoe reagiert hatte. Eine Familienuntersuchung ist hier leider nicht möglich.

Über die Verteilung der gemessenen Esteraseaktivitäten gibt Abb. 4 Aufschluß. Die Darstellung gilt für eine Reaktionsdauer von 3 min.

Das technisch aufwendige spektrofotometrische Verfahren kann in vielen Fällen durch einen Agardiffusionstest ersetzt werden. Diese Methode wurde von HARRIS und ROBSON (1963) sehr eingehend beschrieben und von GOEDDE und FUSS (1964) erfolgreich zu orientierenden Familienuntersuchungen eingesetzt. Sie beruht gleichfalls auf der unter-

schiedlichen Inhibition der Esterasevarianten und ist vor allem für klinische Zwecke zu empfehlen. Träger des Gens *d* werden sicher erfaßt.

Zusammenfassung

Eingangs werden erbliche Enzymvarianten als exakt faßbare Merkmalssysteme im menschlichen Blut herausgestellt. Anschließend wird die klinische, toxikologische und forensische Seite der Pseudocholinesterasen beleuchtet. Auf eine Darstellung genetischer Zusammenhänge folgt die Beschreibung der im Berliner Institut für gerichtliche Medizin geübten Technik zur Bestimmung der Dibucainzahlen (Verfahren nach KALOW). Den Abschluß der Arbeit bildet die Demonstration eigener Ergebnisse.

Literatur

- GOEDDE, H. W., K. ALTLAND u. K. BROSS: Genetik und Biochemie der Cholinesterasen. Dtsch. med. Wschr. 88, 2510 (1963).
- , u. W. FUSS: Differenzierung von Pseudocholinesterase-Varianten im Diffusionstest. Klin. Wschr. 42, 286 (1964).
- HARRIS, H., D. A. HOPKINSON, E. B. ROBSON, and M. WHITTAKER: Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. Ann. hum. Genet. 26, 359 (1963).
- , and E. B. ROBSON: Screening tests for the "atypical" and "intermediate" serum-cholinesterase types. Lancet (1963 II), 218.
- , and M. WHITTAKER: Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: Recognition of two new phenotypes. Nature (Lond.) 191, 496 (1961).
- — The serum cholinesterase variants. A study of twenty-two families selected via the "intermediate" phenotype. Ann. hum. Genet. 26, 59 (1962).
- HOPKINSON, D. A., N. SPENCER, and H. HARRIS: Genetical studies on human red cell acid phosphatase. Hum. Genet. 16, 141 (1964).
- KALOW, W.: Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase. J. Pharmacol. exp. Ther. 104, 122 (1952).
- Pharmacogenetics. Heredity and the response to drugs. Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. 1962.
- , and R. O. DAVIES: The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1958).
- , and K. GENEST: A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase, determination of dibucaine numbers. Canad. J. Biochem. 35, 339 (1957).
- — and N. STARON: Kinetic studies on the hydrolysis of benzoylcholine by human serum cholinesterase. Canad. J. Biochem. 34, 637 (1956).
- , and D. R. GUNN: Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. Ann. hum. Genet. 23, 239 (1959).
- , and N. STARON: On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. Canad. J. Biochem. 35, 1305 (1957).
- LIDDELL, J., H. LEHMANN, D. DAVIES, and A. SHARIF: Physical separation of pseudocholinesterase variants in human serum. Lancet (1962 I), 463.
- — and E. SILK: A "silent" pseudocholinesterase gene. Nature (Lond.) 193, 561 (1962).

- NACHMANSON, D., and I. B. WILSON: The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Advanc. Enzymol.* **12**, 259 (1951).
- SAMICO, A. R., H. B. COUTINHO, J. T. ROCHA, and R. L. HUNTER: The zymogram method as a tool for the characterization of unknown blood after it has dried. *J. forens. Sci.* **7**, 480 (1962).
- SZEINBERG, A., M. MAYER, Z. EISENBERG, E. OSTFELD, R. BAR-OR, and R. EZRA: Atypical pseudocholinesterase and sensitivity to suxamethonium in Jewish subjects. *Israel med. J.* **22**, 137 (1963).

Dr. Georg RADAM
Institut für gerichtliche Medizin
der Humboldt-Universität Berlin
104 Berlin 4, Hannoversche Str. 6