

## Quantitative Untersuchungen zur Entwicklung des Aminosäure-Spektrums in faulender Leber

W. BONTE und J. RUSTEMEYER

Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen (BRD)

Eingegangen am 20. März 1975

Quantitative Investigation of the Amino Acid Levels in Putrefying Liver

*Summary:* To elucidate the post-mortem proteolysis we investigated the behaviour of the free amino acids in rotting liver homogenates by means of two-dimensional thin-layer chromatography and reflection densitometry. The post-mortem alterations of the amino acid levels are characterized mostly by a two-phase increase with maxima at the end of the first and after the third week. A few amino acids showed only little changes hardly above the physiological intra-cellular levels. Anaerobic rot experiments and experiences with antibiotic treatment give rise to the supposition that increasing amino acid concentrations indicate a predominance of proteolytic activities over amino acid catabolism. In the beginning autoenzymes are prevalent, while afterwards bacterial proteases probably predominate. The transient regression about the second and third week is interpreted as the effect of a temporarily intensified amino acid degradation by foreign enzymes (maximal bacterial growth).

*Zusammenfassung:* Als Beitrag zur Aufklärung des postmortalen Eiweißabbaus wurde das Verhalten der freien Aminosäuren in faulendem Leberbrei mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Reflexionsdensitometrie untersucht. Die postmortale Entwicklung der Aminosäurespiegel ist in der Regel durch einen zweiphasigen Anstieg mit Gipfeln etwa zum Ende der ersten und nach der dritten Woche gekennzeichnet; in einigen Fällen fanden sich auch nur geringe Bewegungen kaum oberhalb des physiologischen Intrazellular-Spiegels. Anaerobe Faulversuche und das Verhalten nach Zusatz eines Antibiotikums lassen vermuten, daß die Konzentrationserhöhungen ein Überwiegen der Proteolyse gegenüber dem Aminosäureabbau anzeigen, wobei anfangs Eigenfermente dominieren, während später wahrscheinlich bakterielle Proteasen überwiegen. Der vorübergehende Rückgang der Aminosäurekonzentrationen um die zweite bis dritte Woche wird als Folge eines kurzzeitig forcierten Aminosäureabbaus durch Fremdenzyme (Maximum des Bakterienwachstums) angesprochen. Die Konzentrationsveränderungen sind temperaturabhängig. Aus den Ergebnissen von Brut- und Kühlschranks-Versuchen ergibt sich ein Q<sub>10</sub> von etwa 2 bis 3.

*Key words:* Fäulnis, Eiweißdegradation - Thanatochemie, Aminosäuren

Nach dem Tode kommt es durch rasches Sistieren der Eiweiß-Synthese (KONIKOVA *et al.*, 1972) zu einer Verschiebung des Protein-Stoffwechsels zugunsten kataboler Molekül-Verkürzungen (BONTE, 1975). Über die fermentativen Prozesse bei der Proteolyse ist nur wenig bekannt; die elektrophoretisch faßbaren Verände-

rungen der Serum-Eiweißkörper (WATERSTRADT, 1952; GRUNDMANN und FISCHER, 1953; SCHLEYER, 1954; SCHULTZE und SCHWICK, 1957; SCHLANG und DAVIS, 1958; BENEKE, 1960; BENEKE und BAHN, 1961; ROBINSON und KELLENBERGER, 1962; LEITHOFF und LEITHOFF, 1963; CURINOWA und ARBISMAN, 1964; HEIFER und BOLKENIUS, 1966; VOLK *et al.*, 1970; MÜLLER, 1971a, b; COE, 1973) lassen sowohl an eine exo- als eine endopeptidatische Wirkung denken. Vor allem durch die letztere kommt es zur Abspaltung einzelner Aminosäuren, welche sich intra- und extrazellulär anreichern. Folge ist eine anfangs streng zur Leichenzeit korrelierte Vermehrung des Amino-Stickstoffs (IHM und SCHLEYER, 1967). Da der Anteil der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Protein-Fraktionen stark variiert und zudem die bisher bekannten Exopeptidasen bestimmte Aminosäuren bevorzugt abspalten (DIXON und WEBB, 1971), müssen sie am Anstieg des Amino-Stickstoffs sehr unterschiedlich beteiligt sein. Die bisherigen papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (WATANABE, 1955; LAVES und WINKLER, 1966; HABA *et al.*, 1970; HAYAKAWA *et al.*, 1970; SHIKATA *et al.*, 1970) scheinen diese Annahme zu bestätigen, ohne eine befriedigende qualitative oder gar quantitative Aussage zu gestatten. Ziel unserer Untersuchungen war es, die wichtigsten Aminosäuren als Metaboliten der postmortalen Protein-Degradation mithilfe neuerer Methoden qualitativ und quantitativ zu erfassen.

#### MATERIAL UND METHODIK

Als Untersuchungsmaterial wurde nach dem Vorgang von SCHMIDT *et al.* (1961) das besonders fermentreiche Lebergewebe herangezogen. Die Proben stammten aus dem laufenden Obduktionsgut und zwar von plötzlich verstorbenen, gesunden Personen. Das Gewebe wurde homogenisiert und, in Portionen von je 1 g aufgeteilt, in unverschlossene Glasgefäße eingebracht (Bechergläser 10 ml). Auf vorherige Entblutung des Organs konnte verzichtet werden, da die intrazellulären Aminosäure-Pools in vivo 10 bis 20fach über den Blutspiegeln liegen. Die Probengläser wurden in feuchten Kammern bei 5°, 20° und 35°C, sowohl in Luft, wie in Stickstoffatmosphäre, in einer Reihe auch nach Zusatz von 1% Gentamycin der Fäulnis überlassen. Alle 3 bis 4 Tage wurden Einzelproben entnommen und tiefgefroren bis zur Parallelauswertung des Gesamtmaterials aufbewahrt.

Nach dem Auftauen wurden die Leberproben mit 3 ml 96%igem Äthanol versetzt (PARTRIDGE, 1954; KLEIN *et al.*, 1970) und 5 Stunden geschüttelt. Nach Filterpassage wurde der Extrakt 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit 0,1 n HCl aufgenommen und mit Äther gewaschen. Die wässrige Phase wurde erneut im Vakuum bis zur Trockne eingeengt und mit 0,5 ml 0,1 n HCl aufgenommen (PATAKI, 1966). Auf vorherige Entsalzung wurde verzichtet (PATAKI, 1964).

Im Hinblick auf die Erfahrungen von HEATHCOTE und HAWORTH (1969) erfolgte die Auftrennung zweidimensional dünnschichtchromatographisch auf Cellulose-Schichten (Merck-Fertigplatten) in Synchron-Kammern (Desaga) nach Kammersättigung (BUJARD, 1964). Das Verfahren soll nach TAYLOR (1970) und HEATHCOTE *et al.*, (1973) der automatischen Ionen-Austauscher-Chromatographie überlegen sein. Als Laufmittel wurde in der ersten Dimension Äthanol 96% / Ammoniak 25% (7:3), in

der zweiten n-Butanol / Eisessig / Aqua dest. (3:3:2) benutzt. Diese Fließmittelkombination trennt Leucin/Isoleucin, Glycin/Serin und Histidin/Ornithin/Lysin nur ungenügend. In Vorversuchen zeigten zwar die von v. ARX und NEHER (1963), PATAKI (1964, 1966), WHITE (1968), PILLAY und MEHDI (1970) sowie HEATHCOTE *et al.* (1973) angegebenen Fließmittelkombinationen teilweise bessere Auftrennungen von Aminosäure-Standard-Mischungen; bei der Chromatographie von Extrakten aus Leichenmaterial stellten sich jedoch störende Schleierbildungen und Schwankungen der Rf-Werte ein, was uns veranlaßte, die Mängel der in dieser Hinsicht störungsfreien, von uns gewählten Laufmittel in Kauf zu nehmen. Aufgetragen wurden jeweils 2 µl (Microcaps Desaga) punktförmig portionsweise unter Zwischentrocknung. Die Laufstrecke betrug in jeder Dimension 160 mm.

Die qualitative Zuordnung der aufgetrennten Flecken erfolgte nach Isatin-Färbung durch Vergleich mit Aminosäure-Standardlösungen (Merck). Zur quantitativen Erfassung empfahl sich nach HEATHCOTE und HAWORTH (1969) die Anfärbung mit Ninhydrin-Cadmiumacetat, welche empfindlicher ist, als die Isatin-Reaktion (OPIENSKA-BLAUTH, 1959).

Wegen der großen Zahl von Einzelmessungen wurde die Elution der Einzelflecken und nachfolgende photometrische Quantifizierung nach anfänglich guten Erfahrungen wegen des zu großen zeitlichen und materiellen Aufwandes wieder verlassen. Als für unsere Zwecke geeigneter erwies sich die Reflexionsdensitometrie in situ, welche mit einigen Modifikationen nach der Arbeitsanleitung von HEATHCOTE und HAWORTH (1969) durchgeführt wurde. Wir benutzten ein Densitometer der Fa. Vitatron (Typ TLD 100) mit Hg-Licht und Filter 496. Verwertet wurden nur saubere, symmetrische Glockenkurven, deren Flächen als Maß für die Konzentration durch einen eingebauten Rechner (UR 402) integriert wurden. Zur Eliminierung von Färbefehlern wurde auf jeder Platte ein "innerer Standard" mitgeführt und bei der Berechnung berücksichtigt. Wegen der komplizierten Proportionalitäts-Verhältnisse (BANCHER *et al.*, 1968) stellten sich die Eichkurven meist als etwas von der Geraden abweichende, leicht gekrümmte Kurven dar, den von BRAUN (1963) abgebildeten nicht unähnlich. In sehr hohen Konzentrationsbereichen macht sich eine deutliche Abflachung der Eichkurven bemerkbar, die gelegentliche Verdünnungen der zu untersuchenden Extrakte erfordert.

Da die Ergebnisse der Vorversuche mit der Isatin-Reaktion bei den endgültigen Ninhydrin-Untersuchungen innerhalb  $\pm 10\%$  zu reproduzieren waren, glauben wir, daß die gewählte Methode für unsere Fragestellung ausreicht. Bei Synchron-Experimenten mit einem in mehrere Portionen aufgeteilten Extrakt differierten die Einzelwerte um 8 bis 11%. Die Recovery betrug 92 bis 102% und war damit zufriedenstellend. Lediglich Alanin war nicht verwertbar (Recovery 78%), obwohl gerade diese Aminosäure die höchsten Konzentrationen aufwies.

#### UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Faulversuche in vitro bei 20°C und ausreichender Belüftung sind in Tab. 1 und Abb. 1 dargestellt. Wiedergegeben sind nur die am klarsten methodisch erfaßbaren Aminosäuren. Von den übrigen physiologisch zu erwartenden Aminosäuren traten Cystin, Cystein, Arginin und Hydroxyprolin überhaupt nicht in Erscheinung; Asparaginsäure, Methionin, Tryptophan, Histidin und Ornithin lagen nur wenig über der Nachweisgrenze von etwa 10 mg/l - also kaum über den physiologischen Intrazellulärspiegeln - ohne merkliche Veränderungen zu zeigen. Prolin wurde wegen differenter Farbreaktion nicht quantitativ gemessen; vom Aspekt her verhielt es sich ähnlich, wie Glutaminsäure. Auch Alanin

Tabelle 1. Ergebnisse der Faulversuche bei 20°C, aerob (Versuch 1)

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
1	0,07	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
3	0,05	0,05	0,01	0,02	0,01	0,05
5	0,04	0,21	0,16	0,09	0,02	0,30
7	0,26	0,53	0,76	0,43	0,11	0,95
10	0,32	0,37	0,64	0,70	0,10	0,97
16	0,24	0,46	0,38	0,33	0,06	0,77
20	0,20	0,46	0,53	0,41	0,05	0,82
26	0,24	0,39	0,45	0,41	0,05	0,69
30	0,78	0,40	0,71	0,94	0,10	1,16
36	0,40	0,57	0,87	0,68	0,06	1,19
40	0,36	0,59	0,80	1,25	0,18	1,37

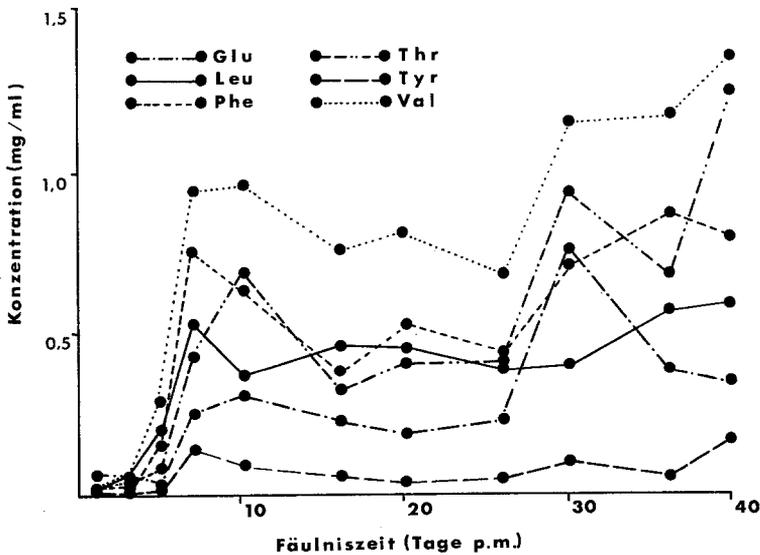


Abb. 1. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 20°C, aerobes Milieu (Versuch 1)

Tabelle 2. Ergebnisse der Faulversuche bei 20°C, aerob (Versuch 2)

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
2	0,09	0,06	0,02	0,03	0,01	0,04
4	0,31	0,31	0,23	0,21	0,06	0,51
6	0,50	0,52	0,53	0,32	0,05	0,87
8	0,37	0,47	0,51	0,16	0,01	0,79
11	0,70	0,57	0,64	0,40	0,01	1,19
15	0,66	0,61	0,68	0,03	0,05	1,15
19	0,50	0,56	0,63	0,02	0,01	1,27
23	0,35	0,55	0,75	0,19	0,03	0,96
27	0,95	0,50	0,78	0,03	0,02	1,63
31	0,84	0,47	0,43	0,29	0,05	1,01
39	0,51	0,49	0,66	0,16	0,02	1,26

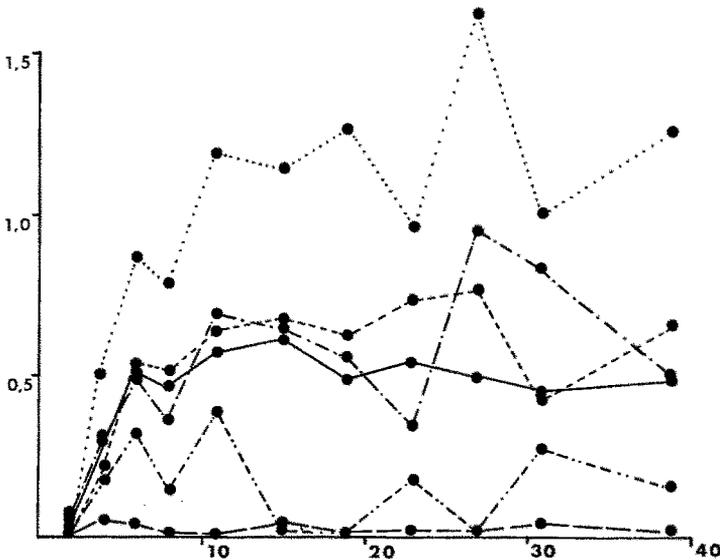


Abb. 2. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 20°C, aerobes Milieu (Versuch 2). Erläuterungen s. Abb. 1

Tabelle 3. Ergebnisse der Faulversuche bei 35°C, aerob

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
1	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04
2	0,15	0,78	0,49	0,30	0,05	0,90
3	0,18	0,97	0,80	0,59	0,05	1,12
4	0,18	1,32	0,94	0,09	0,10	2,15
6	0,02	0,02	-	-	0,18	0,45
8	-	-	-	-	0,16	-
12	-	-	-	-	-	-

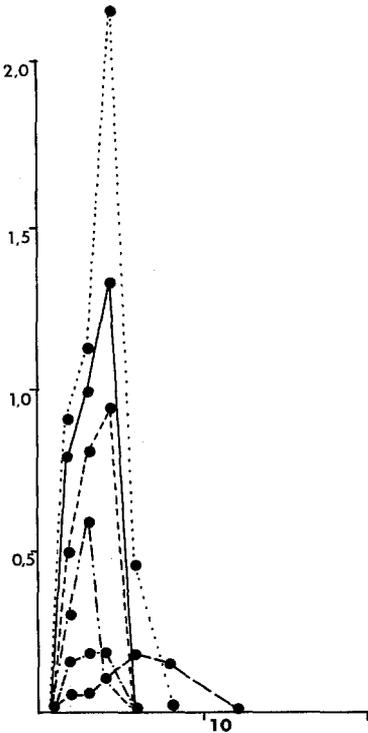


Abb. 3. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 35°C, aerobes Milieu. Erläuterungen s. Abb. 1

(s.o.) wies ähnliche Konzentrationsveränderungen auf. Das Gleiche gilt für den Komplex Glycin/Serin, der wegen ungenügender Auftrennung ebenfalls nicht verwertet wurde.

Tabelle 4. Ergebnisse der Faulversuche bei 5°C, aerob

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
2	0,07	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
6	0,09	0,10	0,10	0,08	0,05	0,10
13	0,10	0,28	0,15	0,15	0,18	0,50
20	0,20	0,33	0,50	0,15	0,15	0,55
27	0,33	0,55	0,50	0,40	0,13	0,73

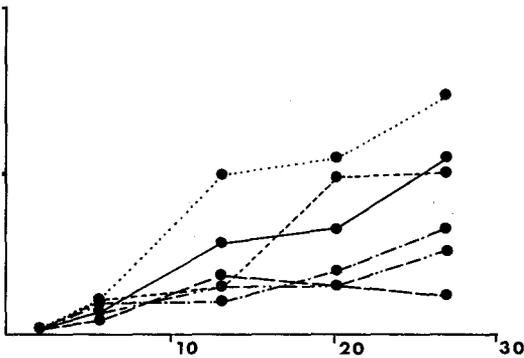


Abb. 4. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 5°C, aerobes Milieu. Erläuterungen s. Abb. 1

Generell zeigte sich ein zweiphasiger Verlauf mit steilem Anstieg der Aminosäurewerte bis etwa zum 5. bis 10. Tag, oftmals ebenso steilem und plötzlichem Abfall zwischen dem 10. und 20. Tag und erneutem Anstieg in der 4. Woche. Dieses generelle Verhalten ist bei Glutaminsäure (Glu), Phenylalanin (Phe), Threonin (Thr) und Valin (Val) besonders akzentuiert, bei den anderen weniger.

Um Vorstellungen über die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse zu gewinnen - vom Versuchsansatz her war die Durchführung einer größeren Zahl von Synchronversuchen nicht möglich - wurde ein kompletter zweiter Faulversuch mit entsprechendem Material (anderen Ursprungs) und gleichartigen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und Abb. 2 wiedergegeben. Beim Vergleich mit den Ergebnissen der ersten Serie findet sich ein ähnlicher initialer Anstieg und nachfolgender Rückgang der Aminosäurekonzentrationen, der hier allerdings meist weniger ausgeprägt ist, als im ersten Versuch. Auch hier schließt sich bei einigen Aminosäuren ein zweiter Anstieg an.

Erwartungsgemäß liefen die Veränderungen bei 35°C (Tab. 3, Abb. 3) wesentlich schneller ab, als bei Raumtemperatur, bei 5°C langsamer (Tab. 4, Abb. 4). Umgerechnet ergibt sich für eine Temperaturerhöhung um 10°C eine Beschleunigung des Aminosäure-Umsatzes um etwa das zwei- bis dreifache ( $Q_{10} = 2$  bis 3).

Die Ergebnisse der Faulversuche in Stickstoff-Atmosphäre bei 20°C zeigen Tab. 5 und Abb. 5. Beim Vergleich mit den Ergebnissen der Raumluft-Versuche fällt auf, daß fast alle Aminosäuren starke und anhaltende Konzentrationserhöhungen erfahren. Bei den meisten ist bis zum Versuchsende kein Absinken zu

Tabelle 5. Ergebnisse der Faulversuche bei 20°C, anaerob

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
1	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04
4	0,31	0,23	0,13	0,18	0,21	0,38
8	0,71	0,49	0,45	0,69	0,10	0,63
12	0,64	0,94	0,70	0,09	0,17	1,08
16	1,02	0,99	0,54	-	0,18	1,12
20	1,58	1,04	0,84	-	0,04	0,96

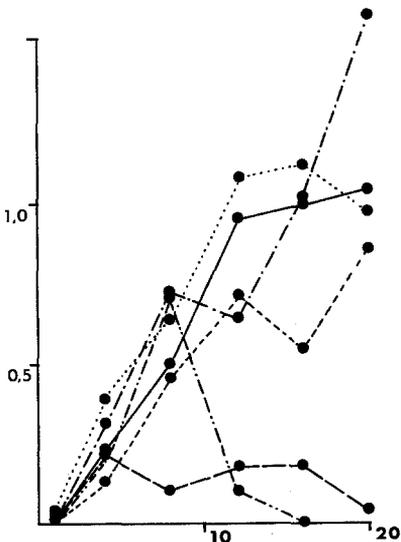


Abb. 5. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 20°C, anaerobes Milieu. Erläuterungen s. Abb. 1

erkennen. Der Aminosäure-Weiterabbau ist offenbar behindert, teilweise womöglich unterbunden.

Nach Zusatz des Breitband-Antibioticums im aeroben Versuch bei 20°C (Tab. 6, Abb. 6) stellte sich nach einem anfänglichen Anstieg bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Valin schon etwa vom 4. Tag an ein sehr deutlicher Rückgang bis fast zu den Ausgangskonzentrationen ein; erst etwa in der 3. Woche kam es zu neuerlichen Konzentrationserhöhungen.

Tabelle 6. Ergebnisse der Faulversuche bei 20°C, aerob, nach Zusatz von 1% Gentamycin

Fäulnisdauer [Tage]	Konzentration [mg/ml]					
	Glu	Leu/Ile	Phe	Thr	Tyr	Val
1	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04
4	0,04	0,35	0,24	0,12	0,27	0,47
8	0,03	0,23	0,17	+	+	0,63
12	0,03	0,37	0,04	+	+	0,98
16	0,14	0,51	0,39	0,33	0,18	0,70
20	0,32	0,54	0,45	0,53	0,24	0,73

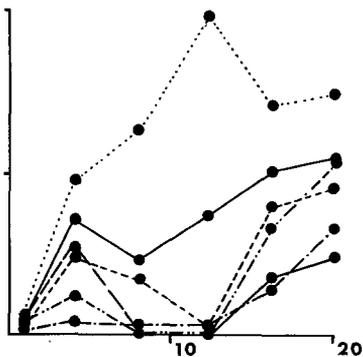


Abb. 6. Freie Aminosäuren im Leberhomogenat. Faulversuch bei 20°C, aerobes Milieu, Zusatz von 1% Gentamycin. Erläuterungen s. Abb. 1

## DISKUSSION

Nach unseren Ergebnissen kommt es bei Raumtemperatur in der ersten Woche nach Organentnahme (bzw. p.m.) zu einem erheblichen Anstieg der intrazellulären Aminosäure-Spiegel, an welchem nicht alle Aminosäuren in gleichem Maße beteiligt sind. Der Anstieg verläuft bei einigen linear, bei anderen exponentiell. Diese Beobachtung läßt sich den Angaben aus der Literatur nur schwer gegenüberstellen, da die früher angewandten Methoden entweder nur zu qualitativen Ergebnissen führten, unspezifisch waren und/oder an anderem Untersuchungsmaterial gewonnen wurden. Die Versuche von SCHMIDT *et al.* (1961) mit faulem Leberbrei wiesen eine Vermehrung der Amino- und Carboxylgruppen bis etwa zum 10. Tag auf, danach gleichbleibende bis rückläufige Werte. Die Ergebnisse entsprechen also in der Tendenz den unsrigen. Absolute Größen sind den Kurven allerdings nicht zu entnehmen. Bedenkt man, daß die von WATANABE (1955) festgestellte Vermehrung der ninhydrin-positiven Banden bei der papierchromatographischen Untersuchung faulenden Lebergewebes gegen Ende der zweiten Woche p.m. ja nur die Konzentrationszunahme von Aminosäuren über die (unbekannte) Nachweisbarkeitsgrenze anzeigt, dann ergibt sich ebenfalls eine gewisse Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen.

Quantitative Vergleiche sind eigentlich nur mit zwei Mitteilungen (mit Einschränkung) möglich. IHM und SCHLEYER (1967) beziffern den Anstieg der Amino-Stickstoff-Konzentration in den ersten 4 Tagen p.m. mit etwa dem 20- bis 30-fachen der Ausgangswerte, was mit unseren Ergebnissen überschläglich übereinstimmen dürfte. SHIKATA *et al.* (1970) sahen in faulender Muskulatur Aminosäure-Anstiege, die den von uns beschriebenen in der Größenordnung weitgehend entsprechen. Besonders interessant ist, daß die japanischen Autoren ebenfalls einen im Wesentlichen zweiphasigen zeitlichen Verlauf beschrieben, der unter Berücksichtigung der Untersuchungstemperatur (30°C) unseren Kurven stark ähnelt.

Der Versuch einer Erklärung dieses zweiphasigen Verlaufs der Aminosäure-Konzentrationen muß von der einfachen Überlegung ausgehen, daß ein Anstieg proteolytische Vorgänge - und zwar im Wesentlichen exopeptidatisch katalysierte - voraussetzt, während der Weiterabbau der Metaboliten entweder sistiert oder jedenfalls gegenüber dem proteolytischen Umsatz zurückbleibt. Andererseits markiert das Absinken der Aminosäurespiegel entweder einen allmählichen Proteolysestop oder ein Überwiegen der desaminierenden und decarboxylierenden Aminosäurespaltung gegenüber dem Eiweißzerfall.

Es liegt nahe, den initialen Anstieg praktisch sämtlicher Aminosäurespiegel auf autolytische Vorgänge zurückzuführen. Auch SCHMIDT *et al.* (1961) kamen ja

schon zu dem Ergebnis, daß die Proteolyse im Wesentlichen eine durch körpereigene Fermente gesteuerte Hydrolyse ist, während der Weiterabbau der Aminosäuren fast ausschließlich durch Bakterien-Enzyme erfolgt. Dafür spricht auch, daß sich bei ersten eigenen Versuchen zur Darstellung der Fäulnisamine gerade in dieser Zeit ein Maximum andeutet. Hierüber soll später berichtet werden. Folgt man diesen Überlegungen, dann müßte der plötzliche Rückgang der Konzentrationen in der zweiten Woche nunmehr das Dominieren der Bakterientätigkeit signalisieren. Nicht ganz einfach wäre dann der nachfolgende Wiederanstieg zu begründen: entweder ist er Ausdruck einer durch Bakterien-Fermente katalysierten Proteolyse; nach JAY and KONTOU (1967) sollen sich einige Bakterienspezies nach dem weitgehenden Verbrauch von Aminosäuren ja auch Proteinmolekülen zuwenden; vgl. auch die Mitteilungen von MÜLLER (1971 a, b). Wir selbst sahen in nicht abgeschlossenen Versuchen eine Beschleunigung der elektrophoretisch erfaßbaren Veränderungen der Plasmaproteine nach Inokulation verschiedener Bakterienstämme. Andererseits könnte man an einen Rückgang des Bakterienwachstums denken - SCHMIDT *et al.* (1961) und LERKE *et al.* (1967) registrierten Maxima des Wachstums um den 10.-15. Tag nach Versuchsbeginn - der der autofermentativen Proteolyse wieder Vorschub leistet.

Interessant ist nun, daß sich bei Sauerstoffentzug ein deutlicher und anhaltender Aminosäureanstieg einstellte. Dieses Verhalten wird kaum anders zu erklären sein, als durch einen weitgehenden Stop des Aminosäureabbaus bei anhaltender Proteolyse. Die sauerstoffunabhängige Peptid-Hydrolyse kann demnach nicht schon nach wenigen Tagen zum Ende kommen, was auch mit den bei längerer Lagerung beobachteten Veränderungen der Serumweißkörper garnicht zu vereinbaren wäre. Diese Überlegung würde die Vorstellung stützen, daß im Raumluft-Versuch bei fortdauernder Proteolyse ein nur vorübergehender Rückfall des Aminosäureanstiegs durch zeitweilig dominierende Weiterabbau-Vorgänge stattfindet. Es bleibt immer noch unklar, ob die Proteolyse allein durch Autofermente besorgt wird.

Wesentlich für die Beantwortung dieser Frage ist das Ergebnis des Antibiotikum-Versuchs. Wäre den Bakterienfermenten ausschließlich eine Rolle im Aminosäureabbau zuzurechnen, dann müßte - da in diesem Fall die Proteolyse primär durch den Bakterienausfall nicht gestört wird - ein ähnlich anhaltender Aminosäureanstieg resultieren, wie im anaeroben Versuch. Das trifft aber nicht zu. Vielmehr kommt es nach einem anfänglichen, nur kurzdauernden Anstieg zu einem markanten Rückgang der Aminosäure-Konzentrationen, der nur dann verständlich ist, wenn man eine tiefgreifende Behinderung der Proteolyse annimmt. Ursache hierfür könnte sein, daß z.B. der Eiweißzerfall nur in der Initialphase von

Autofermenten katalysiert wird und schon bald bakterielle Enzyme mitwirken, dann dominieren und zuletzt allein wirksam sind. Bakterien-Proteinasen, sowohl Exo-, als Endo-Peptidasen sind wiederholt nachgewiesen worden (DIXON und WEBB, 1971).

Auf der anderen Seite ist zu bedenken, daß Proteinase wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Metaboliten des Aminosäureabbaus bzw. von Endprodukten, wie  $H_2S$ , angewiesen sind, um die Peptidbindungen der Proteine spalten zu können (NETTER, 1959, YEMM, 1958). SCHMIDT *et al.* (1959) sahen bei  $H_2S$ -Mangel stockende Proteolyse. LERKE *et al.* (1967) beobachteten nach Aufteilung eines bakterieninfizierten Muskelpreßsaftes in eine Protein- und eine proteinfreie Fraktion lediglich in der letzteren Abbauvorgänge. Nach Vereinigung der Fraktionen wurde der Aminosäureabbau beschleunigt, gleichzeitig kam aber auch die Proteolyse in Gang. Danach wäre zu diskutieren, ob durch die Unterbrechung des Protein-Katabolismus bei den Aminosäuren und den damit verbundenen Mangel an Weiterabbauprodukten nicht sekundär auch eine Hemmung der Peptidase-Tätigkeit bewirkt wird. Unverständlich wäre dann allerdings, daß im anaeroben Faulversuch, der ja zweifellos auch durch den Mangel solcher Final-Metaboliten gekennzeichnet ist, nicht ebenfalls eine auffallende Proteolyse-Hemmung verzeichnet wurde.

Mehrdeutig ist der Aminosäure-Spätanstieg im Antibioticum-Versuch. Wahrscheinlich ist das Antibioticum zu dieser Zeit selbst degradiert oder sonst wirkbehindert, sodaß die bakterielle Proteolyse wieder auflebt. Vielleicht besteht auch ein Zusammenhang mit einer auffallenden Pilzbesiedlung der Proben gegen Ende der zweiten Woche. Auch in Pilzen wurden ja Proteasen gefunden (DIXON und WEBB, 1971). Wir selbst haben in noch nicht abgeschlossenen Faulversuchen mit Rinderblut nach Inokulation von *Candida albicans*-Kulturen eine erhebliche Proteolyse-Beschleunigung festgestellt.

Die Kühlschranks- und Brutschrank-Versuche haben die erwartete Verzögerung bzw. Beschleunigung des charakteristischen zeitabhängigen Konzentrationsverlaufs der Aminosäuren aufgezeigt. Der Temperaturkoeffizient  $Q_{10}$  liegt zwischen etwa 2 und 3 und fügt sich damit durchaus in das physiologisch zu erwartende Bild ein.

#### LITERATUR

- ARX, E.V., NEHER, R.: Eine multidimensionale Technik zur chromatographischen Identifizierung von Aminosäuren. *J. Chromatogr.* 12, 329-341 (1963)
- BANCHER, E., WASHÜTTL, J., OLFAT, M.D.: Quantitative Bestimmung von Aminosäuren auf Grund der Fleckengröße bei einem zweidimensionalen DC-Trennverfahren. *Mikrochim. Acta* 1968, 773-777
- BENEKE, G.: Über die Ursachen der postmortalen Veränderungen des Serumpherogrammes. *Z. ges. inn. Med.* 15, 323-327 (1960)

- BENEKE, G., BAHN, K.-J.: Veränderungen des Serum- und Liquorpherogrammes menschlicher Leichen in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Tode. *Z. ges. inn. Med.* 16, 232-236 (1961)
- BONTE, W.: Der postmortale Eiweiß-Katabolismus. *Beitr. gerichtl. Med.* 33, 57-75, (1975)
- BRAUN, L.: Zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren unter Verwendung der Hochspannungselektrophorese. *Biochem. Z.* 339, 8-12 (1963)
- BUJARD, E.: Séparation bidimensionnelle des acides aminés basiques neutres et acides par chromatographie en couche mince sur cellulose. *Chromatogr. Symp.* 3, 145-152 (1964)
- COE, J.I.: Comparison of antemortem and postmortem serum proteins. *Bull. Bell Mus. Pathobiol.* 2, 40-42 (1973)
- CURINOWA, E.G., ARBISMAN, D.M.: Die Dynamik der Eiweißfraktionen im Serum von Fibrinolyseblut in Abhängigkeit von der Dauer seiner Aufbereitung und Aufbewahrung. *Probl. Gemat.* 9, 45-54 (1964)
- DIXON, M., WEBB, E.C.: *Enzymes*. London: Longman, 1971
- GRUNDMANN, G., FISCHER, R.: Beitrag zur Alterung von Blutkonserven. *Bluttransfusion* 2, 18-20 (1953)
- HABA, K., OKANE, M., ITO, K.: Free amino acids in postmortem human blood. *Mie med. J.* 20, 113-124 (1970)
- HAYAKAWA, S., SAITO, S., SATOH, K.: Identification of antemortem and postmortem blood. *Jap. J. Leg. Med.* 24, 48-54 (1970)
- HEATHCOTE, J.G., HAWORTH, C.: The direct determination of amino acids on thin-layer chromatograms by densitometry. *Biochem. J.* 114, 667-668 (1969)
- HEATHCOTE, J.G., KEOGH, B.J., WASHINGTON, R.J.: The influence of peptides on the analysis of amino acids by thin-layer and ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 78, 181-191 (1973)
- HEIFER, U., BOLKENIUS, M.: Gc-Diagnostik und Proteolyse in gelagerten Bluten, Leichenbluten und Blutspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 58, 76-90 (1966)
- IHM, P., SCHLEYER, F.: Fehlerkritische Betrachtungen über die Todeszeitberechnung anhand biochemischer Komponenten im Zisternenliquor und Serum. *Arch. klin. Med.* 214, 20-33 (1967)
- JAY, J.M., KONTOU, K.S.: Fate of free amino acids and nucleotides in spoiling beef. *Appl. Microbiol.* 15, 759-764 (1967)
- KLEIN, A., CHUDZIK, J., SARNECKA-KELLER, M.: The application of thin-layer electrophoresis and chromatography on Sephadex G-25 to the analysis of amino acid and peptide composition of biological fluids. *J. Chromatogr.* 53, 329-336 (1970)
- KONIKOVA, A.S., POGASOVA, A.V., NIKULIN, V.I.: Restoration of protein synthesis after death and the effect of postmortal cooling. *Nature New Biol.* 235, 83-85 (1972)
- LAVES, W., WINKLER, A.: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an vitalen und postmortalen Blutseren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 57, 424-430 (1966)
- LEITHOFF, H., LEITHOFF, I.: Immunelektrophoretische Differenzierung der Proteine faulen Leichenblutes. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 54, 286-296 (1963)
- LERKE, P., FARBER, L., ADAMS, R.: Bacteriology of spoilage of fish muscle. *Rôle of protein.* *Appl. Microbiol.* 15, 770-776 (1967)
- MÜLLER, H.E.: Methodische Untersuchungen in vitro zur Einwirkung bakterieller Proteasen auf menschliche Plasmaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 216, 79-87 (1971)
- MÜLLER, H.E.: Immunelektrophoretische Untersuchungen zur Einwirkung bakterieller Enzyme auf menschliche Plasmaproteine. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 217, 254-274 (1971)
- NETTER, H.: *Theoretische Biochemie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1959
- OPIENSKA-BLAUTH, J.: Critical evaluation of methods used in amino-aciduria investigations. *Clin. chim. Acta* 4, 841-860 (1959)

- PARTRIDGE, S.M.: Separation of amino acids and lower peptides by displacement chromatography by the use of ion-exchange resins. *Brit. med. Bull.* 10, 241-246 (1954)
- PATAKI, G.: Papier-, Dünnschicht- und Elektro-Chromatographie von Aminosäuren in biologischem Material. *Z. klin. Chem.* 2, 129-138 (1964)
- PATAKI, G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie. Berlin: De Gruyter, 1966
- PILLAY, D.T.N., MEHDI, R.: Separation of amino acids by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 47, 119-123 (1970)
- ROBINSON, D.M., KELLENBERGER, R.E.: Comparison of electrophoretic analyses of antemortem and postmortem serums. *Amer. J. clin. Path.* 38, 371-377 (1962)
- SCHLANG, H.A., DAVIS, D.R.: Paper electrophoretic studies of postmortem serum proteins. *Amer. J. med. Sci.* 236, 472-474 (1958)
- SCHLEYER, F.: Papierelektrophoretische Untersuchungen des Eiweißbildes von Leichenseren. *Arch. exp. Path. Pharm.* 221, 306-311 (1954)
- SCHMIDT, O., FORSTER, B., SCHULZ, G.: Untersuchungen über die Anteile der Eigen- und Fremdfermente am postmortalen Eiweißzerfall. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 52, 28-45 (1961)
- SCHMIDT, O., LORKE, D., FORSTER, B.: Studie über postmortale Abbauvorgänge. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 49, 206-212 (1959)
- SCHULTZE, H.E., SCHWICK, G.: Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine. *Behringwerk-Mitt.* 33, 11-38 (1957)
- SHIKATA, I., MAEIWA, M., OTANI, T.: Postmortem changes in muscles; changes in the concentrations of free amino acids in muscle Tokushima. *J. exp. Med.* 17, 21-31 (1970)
- TAYLOR, I.E.P.: Artefacts in amino acid analysis. Ninhydrin-positive products of carbohydrate hydrolysis. *J. Chromatogr.* 50, 331-333 (1970)
- VOLK, P., GOSTOMZYK, J.G., SCHÄFER, B., RECK, R.: Probleme zur Transfusion postmortal entnommenen Blutes. *Z. Rechtsmedizin* 67, 1-18 (1970)
- WATANABE, H.: On the putrefaction process investigated by the so-called paper chromatography of amino-acids, amines and their similar compounds. *Jap. J. Leg. Med.* 9, 561-574 (1955)
- WATERSTRADT, K.: Über die Stabilität der Serumproteine. *Ärztl. Forsch.* 6, 181-184 (1952)
- WHITE, H.W.: Separation of amino acids in physiological fluids by two-dimensional thin-layer chromatography. *Clin. chim. Acta* 21, 297-302 (1968)
- YEMM, E.W.: Biochemical mechanisms in the synthesis and breakdown of proteins. In: Ruhland, W. (Ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Vol. 8. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1958

Dr. med. Wolfgang BONTE  
 Institut für Rechtsmedizin  
 der Universität  
 D-3400 Göttingen, Geiststr. 7  
 Bundesrepublik Deutschland