

Originalarbeiten – Original Papers

Vergleichende Untersuchungen über zeitabhängige Veränderungen im Eiweißspektrum von Vital- und Leichenblut mit der Celluloseacetatfolien-(CAF)-Elektrophorese

H.-J. Mittmeyer und J. Schwend

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität, Nägelstraße 5, D-7400 Tübingen,
Bundesrepublik Deutschland

Time-Dependant Changes in the Protein Spectrum of Blood from Living and Dead Persons by Means of Electrophoresis in Cellulose Acetate

Summary. Protein electrophoresis on cellulose acetate shows that with increasing hemolysis of ante- and postmortem blood an extragradient in the α_2 -globulin field is created, which influences the relative ratio in the electropherogram. Strong hemolysis causes a fusion of the α_2 - and β -globulin chains. In order to make a diagnostic interpretation of postmortem blood by means of electrophoresis, it is therefore essential to take into account the degree of hemolysis. Changes in the electrophoretic pattern due to hemolysis correlate best with the period of storage. With regard to timing for forensic purposes, the value is, however, limited.

Key words: Electrophoresis, time-conditioned changes – Protein spectrum, blood from living and dead persons – Postmortem changes, blood from dead persons

Zusammenfassung. In systematischen Untersuchungen wird gezeigt, daß es mit zunehmender Hämolyse im Vital- und Leichenblut in der Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAF) zu einem Extragradienten im α_2 -Globulinbereich kommt, der die relativen Verhältnisse im Elektropherogramm beeinflusst. Bei starker Hämolyse tritt eine Verschmelzung der α_2 - und β -Globulinbanden auf. Um eine diagnostische Beurteilung am Leichenblut mit der Elektrophorese durchzuführen, muß deshalb in erster Linie der Hämolysegrad berücksichtigt werden. Die durch Hämolyse bestimmten Veränderungen im elektrophoretischen Muster sind mit der Liegezeit am ehesten korreliert, wobei jedoch der Aussagewert bezüglich forensischer Zeitstellungen gering ist.

Schlüsselwörter: Elektrophorese, zeitabhängige Veränderungen – Eiweißspektrum, Vitalblut u. Leichenblut – postmortale Veränderungen, Leichenblut

1954 veröffentlichte Schleyer Ergebnisse über systematische papierelektrophoretische Untersuchungen des Eiweißbildes von Leichenseren. Er ging im wesentlichen von der Fragestellung aus, ob es in postmortalen Serumeiweißspektren zu Veränderungen kommt, inwieweit Rückschlüsse auf die vitalen Verhältnisse möglich sind und ob derartige Veränderungen mit der Leichenzeit korrelieren. In Abhängigkeit zum postmortalen Entnahmezeitpunkt fiel generell eine Verringerung der Albuminanteile bis auf die Hälfte der Vitalblutwerte auf, mit entsprechender relativer Zunahme der gröber dispersen Globuline. Diesbezüglich glaubten Beneke und Bahn (1961) an ein Abwandern der relativ kleinmolekularen Albumine in den extravasalen Raum. Robinson und Kellenberger (1962) publizierten eine umfangreiche Studie über den Vergleich von ante- und postmortalem Blut, ebenfalls durch Auftrennung der Proteine mittels Papierelektrophorese. Sie fanden, daß das postmortale Blut einen höheren und breitbasigeren Peak im β -Globulinbereich als das Vitalblut aufweist. Diese Feststellungen stimmen mit den papierelektrophoretischen Untersuchungsergebnissen von Schlang und Davis überein, die bereits 1958 postmortal einen relativ konstanten Anstieg in der β -Globulinfraktion beschrieben. Robinson und Kellenberger (1962) führten diese elektrophoretischen Veränderungen auf die fortschreitende Hämolyse zurück.

Unter Verwendung der Celluloseacetatfolienelektrophorese verglich COE (1973 und 1974) Vital- und Leichenblut, wobei er eine gute Übereinstimmung fand, außer bei stärkerer Hämolyse im Serum.

Material und Methodik

Acht Vitalblutproben aus der Cubitalvene wurden in 64 Untersuchungen ausgewertet, für die je acht Anteile Vollblut zu rund 2 ml in Reagenzröhrchen vorgelegt wurden. Die einzelnen Anteile wurden jeweils umgehend und danach in zeitlichen Abständen von je einem Tag untersucht. Die Lagerung erfolgte bei Kühlschranktemperatur. Vor jeder elektrophoretischen Auftrennung wurden die vorgelegten Vollblutproben über fünf Minuten bei 2500 U/Min zentrifugiert und danach das mehr oder minder hämolytische Serum abpipettiert. Am Serum wurde das Gesamteiweiß nach der Biuret-Methode bestimmt und die Elektrophorese zur Eiweißfraktionierung durchgeführt.

Insgesamt wurden 45 Untersuchungen auf Gesamt-Eiweiß (Biuret-Methode) mit elektrophoretischen Auftrennungen an fünf Leichenblutproben vorgenommen, wobei die Proben in neun Vollblutportionen aufgeteilt und diese bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden. Die ersten sieben Ansätze wurden in eintägigem Abstand, der achte Ansatz nach zwei Wochen und die am längsten aufbewahrte Teilprobe nach einem Monat ausgewertet. Vor der Untersuchung erfolgte auch hier Zentrifugieren bei 2500 U/Min und Abpipettieren des Überstandes.

Die elektrophoretischen Auftrennungen der Bluteiweißkörper erfolgten mit dem Beckman^R-Mikrozone^R-Elektrophorese-System der Firma Beckman^R Instruments, München. Als Trägermaterial dienten Celluloseacetatfolien (CAF) im Format 57 auf 145 Millimeter (Typ SM 11200) der Firma Sartorius GmbH, Göttingen. Die transparenten Celluloseacetatfolien wurden mit dem Beckman^R-Mikrozone^R-Densitometer Modell R110 photoelektrisch ausgemessen und in Verbindung mit dem Beckman^R-Mikrozone^R-Digital Integrator Modell R-111 mit der Integrator- und der Recheneinheit ausgewertet.

Ergebnisse

In zeitlichen Abständen von je einem Tag wurden Vitalblutproben untersucht. In gleicher Weise wurden 5 Leichenblutproben untersucht. Die in den Elektropherogrammen erhaltenen relativen Verhältnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Man erkennt im wesentlichen eine kontinuierliche Zunahme des relativen Anteils der α_2 -Globuline. Demgegenüber zeigt die Albumin-Fraktion während des einwöchigen

Tabelle 1. Verhalten der Eiweißfraktionen im Vitalblut (N = 8) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung nach Tagen	Albumin rel. %		α_1 -Glob. rel. %		α_2 -Glob. rel. %		β -Glob. rel. %		γ -Glob. rel. %	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
0	56.8	4.0	3.8	1.2	9.4	1.4	14.1	2.6	15.9	2.9
1	56.5	4.3	3.9	1.2	9.7	1.1	14.8	2.5	15.0	3.0
2	55.5	5.1	3.8	0.9	9.9	2.1	16.0	2.5	14.8	2.4
3	55.8	3.4	3.6	0.9	10.0	1.9	16.2	2.6	14.3	2.8
4	54.8	3.7	3.7	1.2	10.7	2.6	16.2	2.3	14.6	2.9
5	53.7	2.9	3.7	1.1	12.3	2.8	16.1	2.3	14.2	2.5
6	52.1	2.9	3.8	1.1	12.9	2.5	16.2	2.6	15.1	2.9
7a	51.5	2.5	3.6	0.9	15.3	2.0	14.0	2.4	15.6	2.6

^aN = 6 – in zwei Fällen war keine exakte Trennung zwischen α_2 - und β -Globulinen mehr möglich
 \bar{x} : Mittelwert; s: Standardabweichung

Tabelle 2. Verhalten der Eiweißfraktionen im Vitalblut (Mittelwerte: N = 8) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und bezogen auf den „Gesamteiweißwert“

Untersuchung nach Tagen	„Gesamt- Eiweiß“ g/100 ml	Albumin g/100 ml	α_1 -Glob. g/100 ml	α_2 -Glob. g/100 ml	β -Glob. g/100 ml	γ -Glob. g/100 ml
0	7.15	4.06	0.27	0.67	1.01	1.14
1	7.14	4.02	0.27	0.72	1.00	1.13
2	7.55	4.16	0.29	0.76	1.16	1.18
3	7.79	4.33	0.30	0.81	1.20	1.16
4	7.96	4.48	0.29	0.88	1.17	1.16
5	8.12	4.47	0.29	0.96	1.23	1.18
6	8.25	4.43	0.29	0.96	1.27	1.29
7a	8.70	4.48	0.31	1.33	1.22	1.36

^aN = 6 – in zwei Fällen war keine exakte Trennung zwischen α_2 - und β -Globulinen mehr möglich

Untersuchungszeitraumes eine relative Abnahme. Die quantitativen Verhältnisse in der α_1 -Globulin-Fraktion sind auffallend konstant. Im Gegensatz hierzu lassen sich in der β -Globulin- und γ -Globulinfraktion keine eindeutig gerichteten Veränderungen mit zunehmender Lagerungszeit feststellen.

Da die Hämolyse die relativen Verhältnisse der Serumeiweißkörper beeinflussen soll, wurden an den Vitalblutproben Gesamteiweißbestimmungen mit der Biuret-Methode unter photometrischer Erfassung des Hämolysegrades durchgeführt. Anhand dieser „Gesamteiweißwerte“ wurden für die einzelnen Fraktionen die absoluten Ver-

Tabelle 3. Verhalten der Eiweißfraktionen im *Leichenblut* (N = 5; Entnahme 20–28 Stunden p.m.) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung nach Tagen	Albumin rel. %		α_1 -Glob. rel. %		α_2 - + β -Glob. rel. %		γ -Glob. rel. %	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
0	45.4	17.2	3.9	2.1	35.9	18.0	14.7	6.9
1	40.3	22.2	3.8	2.9	39.5	23.0	16.4	7.2
2	40.4	20.3	3.8	2.2	39.7	21.7	16.0	6.4
3	39.6	20.1	3.8	3.0	40.5	21.0	16.1	6.7
4	38.5	18.5	3.9	2.6	40.7	19.5	16.9	5.3
5	35.9	15.9	3.9	3.2	45.4	17.3	14.7	5.5
6	35.4	15.1	3.8	2.6	49.4	18.3	11.4	4.5
14	28.4	11.9	3.7	2.0	54.2	13.7	13.7	6.4
28	25.7	13.5	3.7	2.3	58.6	17.8	12.0	6.6

\bar{x} : Mittelwert; s: Standardabweichung

Tabelle 4. Verhalten der Eiweißfraktionen im *Leichenblut* (Mittelwerte: N = 5; Entnahme: 20–28 Stunden p.m.) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und bezogen auf den „Gesamteiweißwert“

Untersuchung nach Tagen	„Gesamt- Eiweiß“ g/100 ml	Albumin g/100 ml	α_1 -Glob. g/100 ml	α_2 - + β -Glob. g/100 ml	γ -Glob. g/100 ml
0	8.76	3.91	0.35	3.30	1.19
1	11.82	4.05	0.40	5.71	1.71
2	13.00	4.50	0.41	6.28	1.84
3	13.12	4.44	0.48	6.49	1.71
4	13.91	4.45	0.48	6.92	2.11
5	14.16	4.37	0.47	7.41	1.88
6	15.08	4.45	0.50	8.61	1.50
14	16.69	4.17	0.57	9.81	2.13
28	17.06	4.02	0.59	10.75	1.67

hältnisse berechnet und in Tabelle 2 zusammengestellt. Tabelle 2 zeigt, daß der „Gesamteiweißwert“ in Abhängigkeit von der Lagerungszeit mit zunehmender Hämolyse ansteigt. Hierdurch kommt es offensichtlich im wesentlichen zu einem absoluten Anstieg in der α_2 -Globulinfraktion. Die relative Abnahme in der Albumin-Fraktion läßt sich absolut nicht nachweisen, vielmehr zeichnet sich zumindest in den ersten Tagen ein leichter Anstieg ab. Für die α_1 -Globulinwerte zeigen sich keine wesentlichen Schwankungen.

Die fünf Leichenblutproben wurden bei den Obduktionen 20 bis 28 Stunden p. m. aus der Schenkelvene entnommen. Die Untersuchungen erfolgten unmittelbar und danach jeweils in eintägigem Abstand. Der achte Ansatz wurde zwei Wochen und der letzte Ansatz vier Wochen nach Entnahme untersucht. Die relativen Anteile der einzelnen Eiweißfraktionen in der Elektrophorese gibt Tabelle 3 wieder. Es ist hier im wesentlichen eine kontinuierliche Zunahme in der zusammengefaßten α_2 - β -Globulinfraktion zu erkennen. Nur in den frühen Ansätzen war im Einzelfall eine Trennung zwischen α_2 - und β -Globulinfraktion möglich, so daß zum Vergleich der Werte dieser Bereich generell summiert wurde. Der relative Anteil der Albumine zeigt demgegenüber eine eindeutige Abnahme, wobei die Werte insgesamt gesehen niedriger sind, als sie bei den Untersuchungen an Vitalblut (Tab. 1) ermittelt wurden. Im γ -Globulinbereich sind keine eindeutig gerichteten Veränderungen mit zunehmender Lagerungszeit erkennbar, im α_1 -Globulinbereich zeichnet sich auch hier eine weitgehende Konstanz der Werte ab. Insgesamt fallen die hohen Standardabweichungen auf.

Die absoluten Verhältnisse wurden auch beim Leichenblut auf den „Gesamteiweißwert“ bezogen, der den Hämolysegrad miterfaßt. Es ist in Tabelle 4 zu erkennen, daß der „Gesamteiweißwert“ mit zunehmender Lagerungszeit stark ansteigt und generell höher liegt als bei den Untersuchungen am Vitalblut (Tab. 2). Bezogen auf die einzelnen Fraktionen repräsentiert sich dieser Anstieg eindeutig in der zusammengefaßten α_2 - β -Globulinzone. Die eindeutige Abnahme der Albuminfraktion in der relativen Auswertung läßt sich unter den absoluten Verhältnissen nicht bestätigen, eher ist in den ersten Tagen ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Vitalblut (Tab. 2) ist in der α_1 -Globulinfraktion ein leichter Anstieg im Untersuchungszeitraum zu erkennen.

Diskussion

Es stellte sich die Frage, ob und in welchem Umfang, sich Unterschiede in Eiweißspektren zwischen Vital- und Leichenblut feststellen lassen. Beneke (1959/1960) hatte diesbezüglich mit zunehmender Liegezeit eine signifikante Abnahme des Gesamteiweißgehaltes im Leichenserum festgestellt und eine Abnahme der Albumine auf ihr Abwandern in den extravasalen Raum zurückgeführt. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß der relative Anteil der Albumine im Leichenserum generell niedriger ist als im Vitalblut. Die hier durchgeführten in vitro Untersuchungen haben ergeben, daß es außerhalb des Gefäßsystems zu einer *relativen* Abnahme der Albumine kommt, sowohl im Vitalblut als auch in der Leichenblutprobe. Dieses Untersuchungsergebnis deckt sich weitgehend mit den Angaben im Schrifttum (Schleyer 1954, Schlang und Davis 1958, Robinson und Kellenberger 1962, Coe 1973). Diesbezüglich wiesen Martinez-Tello et al. (1965) darauf hin, daß es mit zunehmender Hämolyse zu einem Extragradien im α_2 - β -Globulinbereich kommt, der sich als Störfaktor auswirke und zwangsläufig zu einer relativen Verminderung der übrigen Fraktionen führe. Diese rein theoretische Erörterung ist durch die vorliegende systematische Untersuchung bestätigt worden: In Bezug auf einen „Gesamteiweißwert“ verhält sich die Albuminfraktion mit zunehmender Lagerungszeit in vitro praktisch konstant, so daß die *absoluten* Verhältnisse weitgehend gewahrt bleiben. Unter photometrischer Erfassung des Hämolysegrades zeigt sich, daß es im wesentlichen zu einem absoluten Anstieg in der α_2 -Fraktion kommt. Demgegenüber wurden bei den papierelektropho-

retischen Untersuchungen von Schleyer 1954, Schlang und Davis 1958 sowie Robinson und Kellenberger 1962 stärkere Anstiege im β -Globulinbereich und von Martinez-Tello et al. 1965 solche im α_2 - β -Globulinbereich gesehen. Offensichtlich kommt es bei Verwendung von Celluloseacetatfolien zu einer Wanderung des Hämoglobins im wesentlichen bis in den α_2 -Globulinbereich. Erst bei starker Hämolyse, wie sie insbesondere bei den Untersuchungen am Leichenblut vorlag, ist eine Trennung der α_2 - und β -Globulinbanden auch auf Celluloseacetatfolien nicht mehr möglich.

Um mit der Elektrophorese eine diagnostische Beurteilung am Leichenblut durchführen zu können, ist in erster Linie der Hämolysegrad zu berücksichtigen. Je fortgeschrittener die Hämolyse ist, um so erheblicher werden die relativen Verhältnisse im Elektropherogramm beeinträchtigt. Bezüglich forensischer Zeitstellungen mit Hilfe elektrophoretischer Untersuchungen an Leichenblut hatte Schleyer 1954 bereits darauf hingewiesen, daß die Ergebnisse nicht streng mit der Todeszeit korreliert sind. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen sind die durch Hämolyse bestimmten Veränderungen im elektrophoretischen Muster am auffälligsten und mit der Liegezeit am ehesten korreliert, wobei jedoch der Aussagegrad verständlicherweise begrenzt ist.

Literatur

- Beneke, G.: Zur Frage der Verwendbarkeit von Leichenseren zur Papierelektrophorese. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 389–392 (1959)
- 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)
- Coe, J. I.: Comparison of antemortem and postmortem serum proteins. *Bull. Bell Mus. Pathobiol.* **2**, 40–42 (1973)
- Coe, J. I.: Postmortem chemistry: Practical considerations and a review of the literature. *J. forens. Sci.* **19**, 13–32 (1974)
- Coe, J. I.: Postmortem chemistries on blood with particular reference to urea nitrogen, electrolytes and bilirubin. *J. forens. Sci.* **19**, 33–42 (1974)
- Martinez-Tello, F., Braun, D., Sawade, H., Haferkamp, O.: Untersuchungen zum Verhalten der Eiweißkörper aus Leichenseren „in der Norm“ und bei Fällen mit akuter Entzündung und Nekrose. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 337–348 (1965)
- Robinson, D. M., Kellenberger, R. E.: Comparison of Electrophoretic Analysis of Antemortem and Postmortem Serum. *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. exper. Path. Pharm.* **221**, 306–311 (1954)

Eingegangen am 11. November 1977