

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. ELBEL)

Über photosensibilisierende, nicht auf Hämatoporphyrin beruhende Wirkungen von Salzsäure-Blutfiltraten

Von

F. SCHLEYER, K. SELLIER und D. NOCKER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Januar 1956)

Der exakte Blutnachweis in Flecken auf Textilien ist entweder durch Blutfarbstoff-Kristallreaktionen im Extrakt oder mikrospektrophotographisch zu führen. DE FRANCESCO empfahl (1952) eine neue Methode:

Der Fleck (Größe nicht angegeben) wird in HCl (Konzentration nicht angegeben) gelöst, der Extrakt mit Wasser verdünnt und ausgiebig mit Wasser filtriert, das Filtrat mit NaOH neutralisiert.

Diese „gebrauchsfertige Hämatoporphyrinlösung“, die der Autor spektroskopisch kontrolliert zu haben angibt, wurde je 5 Mäusen als je 6, 4 und 2 „mg Hämatoporphyrin“ injiziert. Bei den ersten beiden Gruppen wurde nach längstens 2 bzw. 15 min Sonnenbestrahlung das typische Bild der Photosensibilisierung, in 7 Fällen mit Verenden der Tiere nach 10 bzw. 30 min, beobachtet. Die Sensibilisierung war dabei viel stärker als bei Vergleichsversuchen mit Handels hämatoporphyrin (ZILLEKEN). Eine Fluorescenz der Versuchslösung oder der Tiere wird nicht erwähnt.

Gegen die Deutung dieser Versuchsergebnisse als Porphyrinwirkung lassen sich bereits theoretisch Zweifel äußern. Zunächst findet die Meinung, aus Blut entstehe durch einfaches Versetzen mit HCl Hämatoporphyrin, in unseren Kenntnissen über die Herstellungsmöglichkeiten von Hämatoporphyrin keine Stütze. Nach Abspaltung des Globins durch Essigsäure läßt sich mittels verdünnter Salzsäure zwar aus dem Hämoglobin Hämin bilden, aus dem aber erst durch Reduktion Hämo-chromogen hergestellt werden muß, welchem dann durch die Salzsäure das Eisen entzogen wird, so daß Hämatoporphyrin resultiert (HOPPESEYLER, BRUGSCH). Voraussetzung ist dabei *Luftabschluß*, da der Luftsauerstoff das Hämoglobin entweder bereits zu Hämiglobin oxydiert hat (in älteren Blutflecken), oder die Säurespaltung die (unbeständige) Fe^{II}- in die (beständige) Fe^{III}-Form überführt. GRINSTEIN behandelt Blut mit Oxalsäure in Gegenwart von Schwefelsäure (die Darstellung aus Protoporphyrin oder aus Hämin mittels Bromwasserstoff-Eisessig, Stehenlassen mit Eisessig-Äther oder Salzsäure, Kochen mit Eisessig oder Schwefelsäure nach H. FISCHER, KÜSTER, WILLSTÄTTER, SCHUMM und Mitarbeitern kann hier übergangen werden). Es handelt sich jeden-

falls immer um differenzierte oder langwierige Verfahren. Ferner setzt DE FRANCESCO Hämatoporphyrin quantitativ gleich Hämoglobin, ohne jedoch zuvor die Hb-Konzentration seiner Blutfleckensextrakte bestimmt zu haben, die „Milligramm Hämatoporphyrin“ sind somit nicht nachrechenbar. Immerhin erschienen aber die Befunde des Autors so auffällig, und das Verfahren des Blutnachweises im biologischen Versuch so neuartig, daß sie zu einer experimentellen Beschäftigung mit den Grundlagen anregten.

Methodik

Ein Teil frisches, menschliches Citratblut wurde mit 3 Teilen konz. HCl versetzt, der Niederschlag wurde unter Übergießen mit Wasser in der 6fachen Menge des Blutes abfiltriert, das trübe Filtrat bis zur Klärung (Neutralpunkt) mit 10% NaOH alkaliert. Nach Absitzenlassen von Flocken und Schlieren wurde noch einmal filtriert. Das Endfiltrat wurde in Mengen von 0,3 (3 Tiere), 0,5 (4 Tiere), 1,0 (11 Tiere), 1,2 (3 Tiere), 1,3 (4 Tiere) und 1,5 cm³ (29 Tiere) Mäusen subcutan injiziert. Die Tiere wurden anschließend mit einer Quarzlampe bestrahlt.

Ergebnisse

Sofort nach Bestrahlungsbeginn wurden alle Tiere mit den Injektionsmengen 1—1,5 cm³ zunehmend lichtscheu, unruhig und taumelig, alsbald kam es zu Sekretfluß aus Nase und Augen, nach etwa 1^{1/2} Std trat Dyspnoe auf. Von insgesamt 47 Tieren mit den Injektionsmengen über 1 cm³ Versuchslösung waren 25 nach 2 Std bei Bestrahlungsende oder bis zum nächsten Tag verendet (das Ausgangsverhältnis Blut : Salzsäure 1 : 3 hatte sich in Vorversuchen als am stärksten toxisch erwiesen). Innerhalb der folgenden Tage schwollen die Köpfchen aller überlebenden Tiere an, die Ohren waren gerötet, die Augen verquollen, die Injektionsstellen zeigten Haarausfall und Nekrosen. Injektionsmengen unter 1 cm³ wirkten schwächer, unterhalb 0,5 cm³ war kein Effekt zu beobachten. Die Versuchslösung fluorescierte nicht.

Tageslicht bewirkte nur eine geringe Lichtscheu, Ataxie und Apathie, aber keine Todesfälle. Sofort nach der Injektion ins Dunkle verbrachte Tiere (je Einzelversuchsansatz ebenfalls mehrere Tiere) wurden nur taumelig, nur 1 Tier mit 1,5 cm³ Versuchslösung starb. Weitere Kontrollversuche mit UV-Bestrahlung ohne Injektion, Bestrahlung nach Injektion von 1,5 cm³ Citratblut ohne Zusätze und nach Injektion von neutralen HCl-NaOH-Gemischen ohne Blutzusatz hatten keinerlei Wirkung.

Vergleichsversuche mit reinem Hämatoporphyrin

50 mg Hämatoporphyrindichlorhydrat-Nordmark (NENCKI, Hämatoporphyrin-gehalt 89,14%) wurde in 3 cm³ 0,5% HCl gelöst, die Lösung wurde mit 10% NaOH neutralisiert bzw. schwach alkaliert. Eine 10⁶fache Verdünnung zeigte im UV-Licht noch deutliche Rottfluoreszenz im Sauren und Alkalischen. Gruppen von je 5 Mäusen wurden je 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 cm³ der Lösung (je Kubikzentimeter

rund 9 mg Hämatoporphyrin) injiziert. Prompt nach Beginn der UV-Bestrahlung entstand das typische Bild der von HAUSMANN beschriebenen Photosensibilisierung mit Fluoreszenz der unbehaarten Körperteile, Unruhe und zum Teil Sekretfluß, am stärksten nach Injektion von 0,6—1,0 cm³ der Lösung, im ganzen schwächer nach Einwirkung von Tageslicht. Ein Tier war am nächsten Tage tot.

Versuche mit 0,8, 1,0, 1,2 und 1,6 cm³ „Photodyn“-Nordmark (0,5% Lösung Hämatoporphyrin-NENCKI, je Kubikzentimeter 5 mg) in der gleichen Anordnung verliefen analog, abgesehen von etwas stärkerer Giftigkeit, wohl infolge saurer Reaktion der Lösung (4 von 20 Tieren eingegangen).

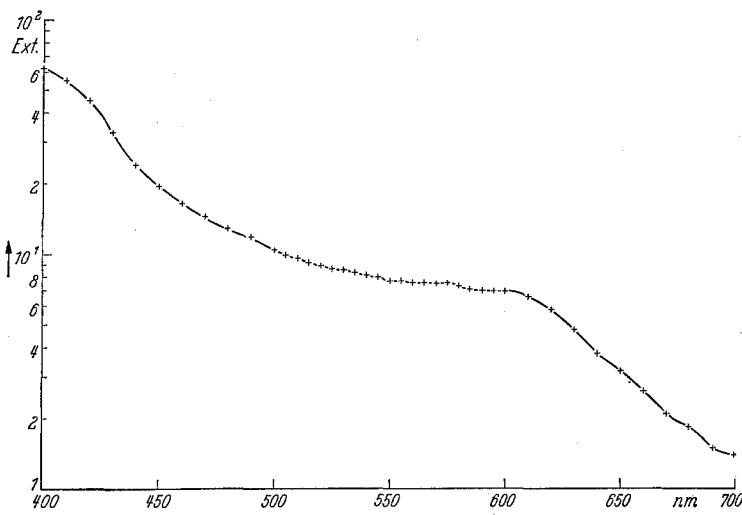


Abb. 1. Absorptionsspektrum des Filtrats der Blut-Salzsäurefällung

Als drittes Präparat wurde (saures) „Bioporphin“-Pharmaka-Labofach (0,5%-Lösung von Hämatoporphyrin-HOPPE-SEYLER, je Kubikzentimeter 5 mg) zu je 0,8, 1,0 und 1,2 cm³ erprobt, ebenfalls mit typischer und starker Wirkung (3 von 15 Tieren eingegangen).

Spektrophotometrische Untersuchung

Abb. 1 zeigt die Extinktionswerte der Injektionslösung aus der Salzsäurefällung des Blutes, Abb. 2 und 3 zum Vergleich die Absorptionspektren von Hämatoporphyrin-Nordmark und „Bioporphin“, Abb. 4 das Spektrum eines Blutfleckenuats nach DE FRANCESCO.

Bioporphin hatte übrigens im Gegensatz zu Hämatoporphyrin-NENCKI im Sauren ausgesprochene Blaufluoreszenz, die im Alkalischen nach Bläulich-Rot überging. Gegenüber Photodyn unterschied sich Bioporphin in den Extinktionen etwa um den Faktor 20—25, ist daher (abweichend von den Angaben der Hersteller) schwächer konzentriert, wie auch schon mit bloßem Auge festzustellen war.

Obwohl das Salzsäurefiltrat der Blutfällung neutralisiert worden war, mußte ein allgemeiner Effekt des Mineralsäure-Blutgemisches ausgeschlossen werden. Daher fällten wir auf dieselbe Weise Blut mit konz.

Schwefelsäure, das dunkelrote, gereinigte Filtrat wurde schwach alkalisiert und in der gleichen Versuchsanordnung wie beim Hauptversuch in steigenden Mengen Gruppen von je 5 Mäusen injiziert. Je 3 Tiere wurden sogleich bestrahlt, je 2 blieben im Dunkeln. Das Sub-

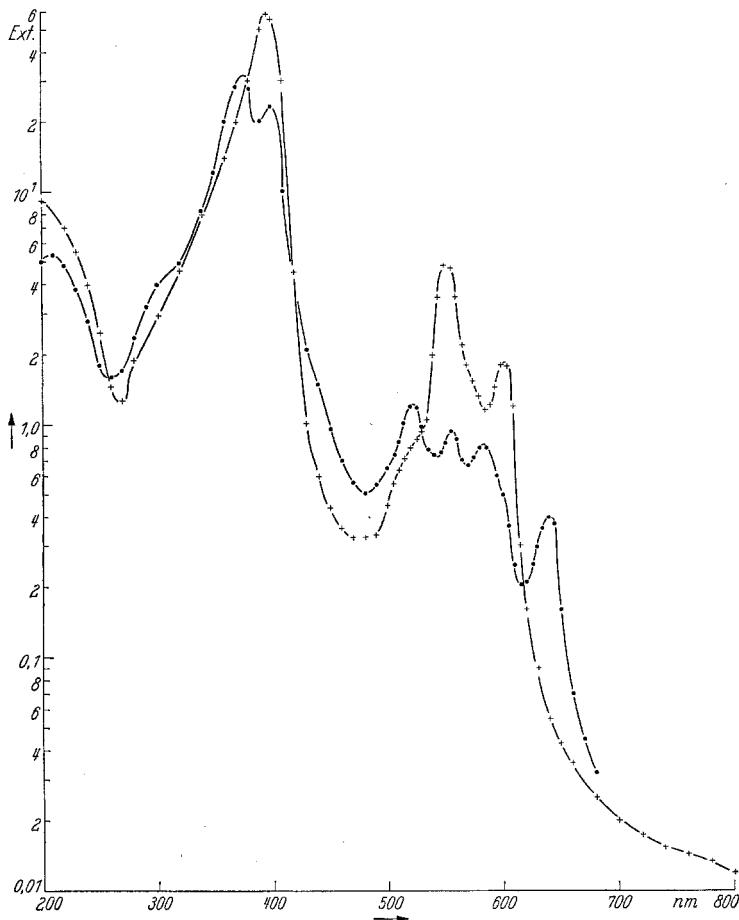


Abb. 2. Absorptionsspektrum von Hämatoporphyrin-Nordmark. (— + — + im Sauren,
- - - - im Alkalischen)

strat erwies sich als hochtoxisch: fast alle Tiere mit der Versuchsmenge 1,0—1,5 cm³ verendeten nach wenigen Minuten oder während der 2stündigen Beobachtung oder wurden nach 12 Std tot aufgefunden, ebenso auch die Tiere, die das Kontrollgemisch Säure-Lauge ohne Blut erhalten hatten. Der einzige Unterschied zwischen dem Verhalten der bestrahlten und der unbestrahlten Tiere war dabei, daß die bestrahlten im allgemeinen erst taumelig, dann aber übererregbar wurden und unter

Krämpfen verendeten, während die unbestrahlten ataktisch-apathisch eingingen. Die Wirkung dieses Substrates kann somit zu dem elektiv-photosensibilisierenden Effekt des Blut-Salzsäurefiltrats nicht in Parallelle gesetzt werden.

Überraschenderweise zeigte die spektrophotometrische Kurve des Schwefelsäure-Blutfiltrats sowohl im Sauren wie danach im Alkalischen die typischen Absorptionsmaxima des *Hämatoporphyrins* (Abb. 5, vgl.

Abb. 2, geringe Abweichungen sind durch die Unreinheit des Produkts zu erklären). Es ist also auf die angegebene einfache Weise möglich,

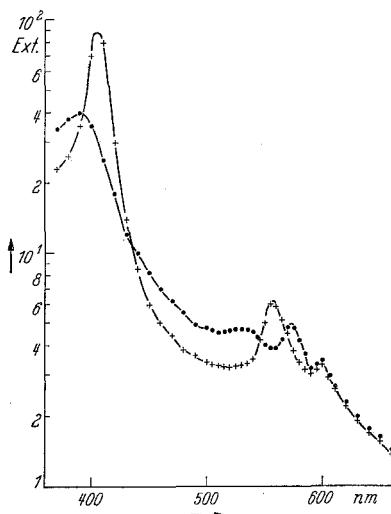


Abb. 3. Absorptionsspektrum von „Biosporphin“ (+---+ im Sauren, -·---· im Alkalischen)

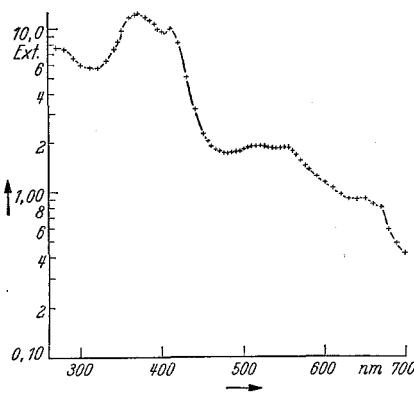


Abb. 4. Absorptionsspektrum des Eluats eines Blutfleckens ($0,5 \text{ cm}^3$ Blut) mit 15 cm^3 konz. Salzsäure

aus frischem Blut Hämatoporphyrin darzustellen. Der Versuch, durch Extraktion großer Blutflecken auf Stoff mittels 55% H_2SO_4 Hämatoporphyrin zu gewinnen, mißlang: der intensiv braunrot gefärbte Säure-extrakt eines 3 Jahre alten, aber auch eines ganz frischen, fein zerkleinerten Fleckens wies spektrophotometrisch keinerlei Extinktionsmaxima auf (Abb. 5, C).

Besprechung

Die Injektion des Blut-Salzsäure-Fällungsfiltrats rief bei den Versuchstieren in der Tat das Syndrom der Photosensibilisierung, übrigens aber auch andere Störungen (Ataxie bei den im Dunkeln gehaltenen Tieren) hervor. Allerdings konnten die Befunde DE FRANCESCO'S quantitativ insofern nicht reproduziert werden, als das direkt aus reinem Blut hergestellte Gemisch, von dem man doch eine noch stärkere Wirkung hätte erwarten sollen als von Blutfleckensextrakten, einen durchaus schwächeren Effekt hatte (insgesamt nur 44% gegen 66% Todesfälle

DE FRANCESCO). Auf *Hämatoporphyrin* war die Wirkung jedoch nicht zurückzuführen, wie aus den eingangs angestellten Überlegungen hervorgeht, und wie es die spektrophotometrischen Resultate bestätigen: die Versuchslösung aus reinem Blut nach Salzsäurefällung zeigte im interessierenden Bereich einen ganz flach abfallenden Verlauf, Blutfleckensextrakt nach der Vorschrift DE FRANCESCO zwar an der Stelle des typischen Absorptionsmaximums bei etwa $550\text{ m}\mu$ ein flaches Plateau, bei $595\text{ m}\mu$ aber keinerlei Veränderung.

Das Filtrat einer Blutfällung mit Salzsäure enthält somit einen Stoff (Chlorhäminal?), der bei der Maus eine durch UV-Bestrahlung sehr intensivierbare toxische Wirkung hat. Diese Wirkung übertrifft die des reinen Hämatoporphyrins. Für die Praxis des Blutnachweises an Flecken erscheint das Verfahren jedoch zu umständlich, da die Blutmengen, die zur Reaktion vermutlich vorhanden sein müssen, längst auch eine mikroskopische Blukristallreaktion gestatten.

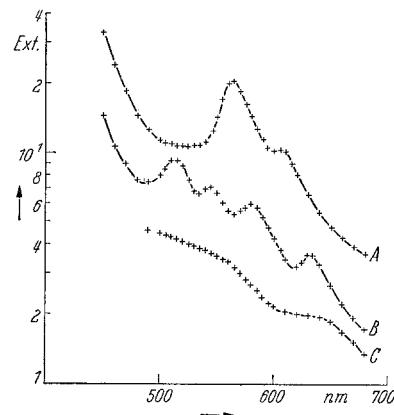


Abb. 5. Absorptionsspektren des Filtrats der Blut-Schwefelsäurefällung (*A* im Sauren, *B* im Alkalischen) und des Eluats eines Blutfleckens mit 55 % Schwefelsäure (*C*). Kurven willkürlich senkrecht verschoben

Zusammenfassung

Bei der Nachprüfung einer zum Blutnachweis in Flecken vorgeschlagenen Methodik des biologischen Versuchs (angebliche Umwandlung des Hämoglobins in Hämatoporphyrin durch Behandlung mit Salzsäure) wurde bestätigt, daß neutralisierte Filtrate aus Blutsalzsäurefällungen bei der Maus eine photosensibilisierende Wirkung haben. Es handelt sich jedoch nicht um einen Hämatoporphyrineffekt. Filtrate aus Blutfällungen mit Schwefelsäure hatten keine photodynamische Wirkung, allerdings ließ sich durch Versetzen von Blut mit Schwefelsäure qualitativ Hämatoporphyrin darstellen.

Literatur

- BRUGSCH, J.: Ein einfacher Nachweis des roten Blutfarbstoffs als Protoporphyrin durch Rotfluoreszenz. Z. inn. Med. 1/2, 191 (1946/47). — FRANCESCO, L. DE: La fotosensibilizzazione da porfirine ematiche per la diagnosi generica di sangue. Fol. med. (Napoli) 35, 1026 (1952). — GRINSTEIN, M.: Studies of Protoporphyrin VII. J. of biol. Chem. 167, 515 (1947). — HAUSMANN, W.: Über die giftige Wirkung des Hämatoporphyrins auf Warmblüter bei Belichtung. Wien. klin. Wschr. 1909, 1820.