

Zur Entstehung fluoreszierender Verbindungen in formalinfixierten Organen*

T. Daldrup und H. Schweitzer

Abteilung Gerichtliche Medizin der Medizinischen Fakultät
der Rhein.-Westf. Techn. Hochschule
Lochnerstraße 4–20, D-5100 Aachen

On Formation of Fluorescent Compounds in Formaldehyde Treated Tissues

Summary. In formaldehyde treated tissues, fluorescent compounds are formed. We could demonstrate, that these compounds result from a reaction of biogenic amines such as β -phenylethylamines or β -(3 indolyl) ethylamines with formaldehyde to yield the fluorescent 3,4 dihydroisoquinolines or 3,4 dihydro- β -carbolines.

Zusammenfassung. In formalinfixierten Organen bilden sich fluoreszierende Verbindungen. Wir konnten nachweisen, daß es sich bei diesen Verbindungen um 3,4 Dihydroisochinoline bzw. 3,4 Dihydro- β -carboline handelt, die durch eine Reaktion des Formaldehyds mit biogenen Aminen des Typs β -Phenyläthylamin bzw. β -(3 Indolyl)äthylamin entstehen.

Key words. Histologie — Formalinfixierung, Bildung fluoreszierender Verbindungen

Bei der Untersuchung formalinfixierter Organe fanden wir in zwei Fällen eine basische Fremdschubstanz mit deutlicher blauer Fluoreszenz bei 254 nm und 366 nm, die sich mit Ameisensäure in ein Formiat überführen ließ.

Gaschromatographisch sowie im UV- und IR-Spektrum verhielt sich die Substanz ähnlich wie Chinin, jedoch führte die Untersuchung des Chinin-Metabolismus und anderer bekannter Chinin-Derivate zu keinem Ergebnis.

Ein Zusammenhang zwischen der Formalinfixierung und dem Auftreten der nicht sicher zu identifizierenden Substanz schien zweifellos vorzuliegen. Durch Untersuchung des jeweils benutzten Formalins konnte ausgeschlossen werden, daß die nicht identifizierte Substanz beigemischt, bzw. zugefügt worden war.

Bei der Durchsicht der einschlägigen Literatur fanden wir eine Veröffentlichung von Falck und Hillarp aus dem Jahre 1961: Hier wird ein Verfahren der Umwandlung von in eine trockene Proteinschicht eingebetteten Catecholaminen in intensiv fluores-

* Auszugsweise vorgetragen auf der 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Frankfurt, September 1975

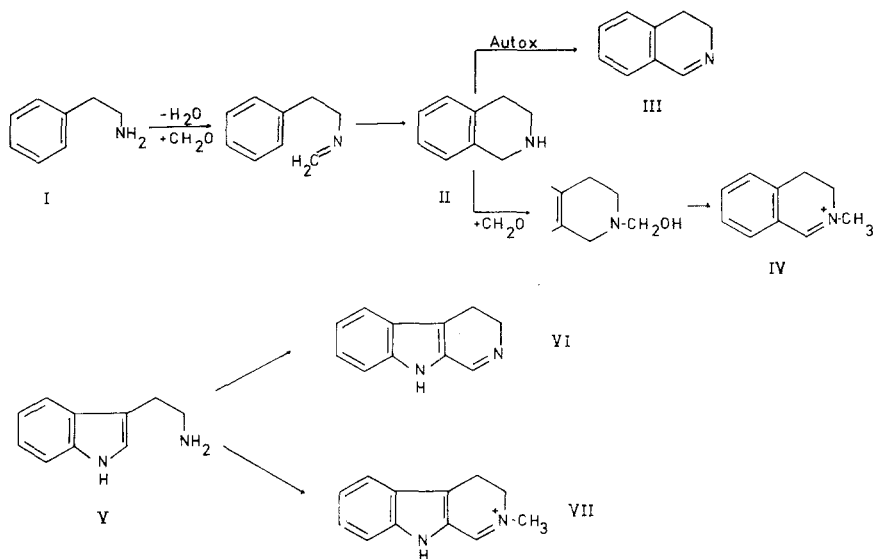


Abb. 1. Reaktion von β-Phenyläthylamin (I) und β-(3-Indolyl)-äthylamin (V) mit Formaldehyd nach Falck-Hillarp

zierende Verbindungen durch Behandlung mit Formaldehyd bei 50° C beschrieben. Das Verfahren wurde zum Fluoreszenzmikroskopie-Nachweis biogener β-Phenyl- bzw. β-(3-Indolyl)-äthylamine vorgeschlagen.

Corrodi, Hillarp, Jonssen, Björklund und Falck klärten in den folgenden Jahren den Reaktionsmechanismus und die Identifizierung der auftretenden Reaktionsprodukte.

In einem ersten Schritt reagieren die Amine entsprechend der Pictet-Spengler-Cyclisierungsreaktion mit Formaldehyd unter Bildung des 1,2,3,4 Tetrahydroisochinolin (II) bzw. des 1,2,3,4 Tetrahydro-β-carbolin. Diese Moleküle zeigen keine oder nur ganz schwache Fluoreszenz.

Die Bildung der fluoreszierenden Verbindungen kann auf zwei Wegen erfolgen: entweder durch Autoxydation unter Bildung der 3,4 Dihydroderivate oder durch nochmalige Reaktion der Tetrahydroderivate mit einem weiteren Molekül Formaldehyd unter Bildung der 2 Methyl-3,4-dihydroverbindungen.

Die Reaktion wird durch Proteine bzw. Aminosäuren katalysiert. Es wird angenommen, daß diese zweite Verbindung das Hauptprodukt der Falck-Hillarp-Reaktion darstellt. Es hat sich gezeigt, daß die Cyclisierungsreaktion mit Formaldehyd besonders gut abläuft, wenn die β-Phenyl- bzw. β-(3-Indolyl)-äthylamine in der Dreierstellung hydroxyliert sind. Dies wird durch eine erhöhte Elektronendichte am Kohlenstoffatom, an dem der Ringschluß stattfindet, erklärt.

Um nachzuprüfen, ob die von uns in den formalinfixierten Organen gefundenen fluoreszierenden Substanzen durch eine entsprechende Reaktion gebildet wurden, d.h. ob biogene Amine auch bei normaler Formalinfixierung entsprechende Isochinoline bzw. β-Carboline bilden, führten wir folgende Versuche durch:

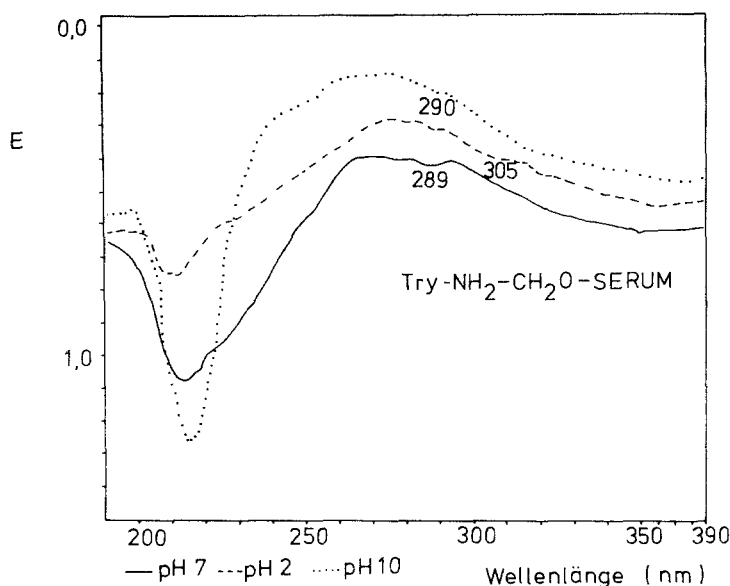


Abb. 2. UV-Spektrum des blau fluoreszierenden Tryptamin-Umsetzungsproduktes nach der Falck-Hillarp-Methode (Versuch 1)

1. Wir wählten als Amin das Tryptamin und setzten es in einer trockenen Serumproteinschicht entsprechend der Falck-Hillarp-Methode um.
2. 50 g Leber wurden nach der Zugabe von 50 mg Tryptamin-Hydrochlorid 24 Stunden in Formalin fixiert.
3. 50 g Leber wurden nach Zugabe von etwa 50 mg Tryptamin-Hydrochlorid 24 Stunden statt in Formalin in Wasser gelegt.
4. 50 mg Tryptamin-Hydrochlorid wurden in Formalin gelöst und 24 Stunden stehengelassen.

Die Proben wurden wie folgt aufgearbeitet:

Nach Ansäuern mit Salzsäure wurde mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde verworfen. Nach Einstellen der verbliebenen wäßrigen Phase auf ein pH von 10 wurde mit Essigsäureisoamylester extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit 0,2 ml 15%iger Ameisensäure ausgiebig geschüttelt. Nach dem Auftragen der Ameisensäurephase auf eine Kieselgel-Fertigplatte wurde im Laufmittelgemisch Toluol-Aceton-Äthanol-Ammoniak im Verhältnis 45 : 45 : 7 : 3 entwickelt. Die Platten wurden unter dem UV-Licht bei 254 nm und 366 nm ausgewertet.

Bei den ersten beiden Proben, d.h. im Tryptamin-Umsetzungsprodukt im Serum nach Falck-Hillarp und in der formalinfixierten Leber fanden sich in 50%iger Laufhöhe je ein sowohl bei 254 nm als auch bei 366 nm blau fluoreszierender Substanzfleck.

In den Negativ-Kontrollen (Versuch 3 und 4) fanden sich erwartungsgemäß keine fluoreszierenden Substanzen.

Die beiden fluoreszierenden Schichten der Dünnschichtchromatogramme von Versuch 1 und 2 kratzten wir aus, eluierten sie mit Äthanol und vermaßen sie im UV-Licht.

Beide UV-Spektren zeigen das typische Absorptionsverhalten der β -Carboline bzw. Isochinoline insbesondere einen geringen Extinktionskoeffizienten mit einem Maximum bei 289 bis 290 nm im neutralen und alkalischen Milieu und einer Verschiebung bzw. einem Zusatzpeak bei 305 nm im sauren Milieu.

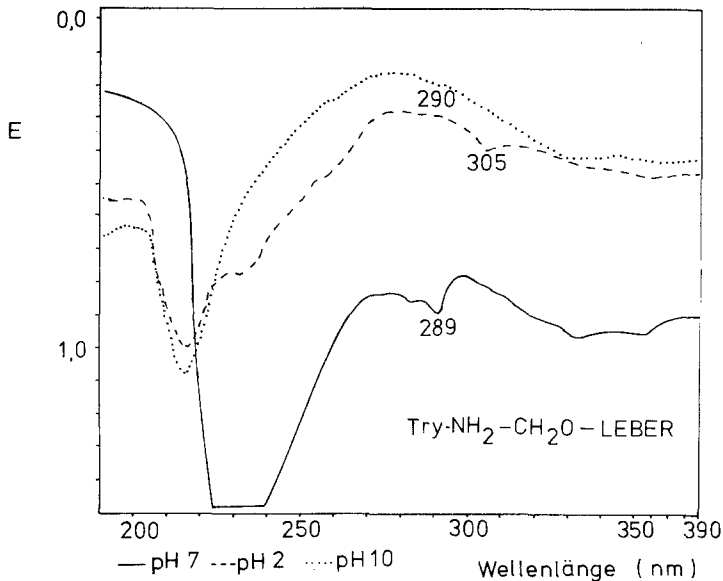


Abb. 3. UV-Spektrum des blau fluoreszierenden Tryptamin-Umsetzungsproduktes entstanden bei der Formalinfixierung (Versuch 2)

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der unbekannten basischen Fremdschubstanz, die wir in den beiden oben beschriebenen Fällen aus den in Formalin fixierten Organen isolierten, zeigt, daß auch diese Fremdschubstanz sowohl bei 254 nm als auch bei 366 nm fluoresziert und das gleiche typische UV-Spektrum besitzt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

1. Biogene Amine des Typs β -Phenyläthylamin bzw. β -(3-Indolyl)-äthylamin bilden bei Formalinfixierung von Organen in einer Reaktion mit Formaldehyd Isochinoline bzw. β -Carboline.
2. Diese Reaktion wurde bisher nur in einer trockenen Proteinschicht beobachtet und durchgeführt (Falck und Hillarp).
3. Der Versuch 3 (Fehlen fluoreszierender Verbindungen bei Tryptaminhydrochlorid und Leber ohne Formalin) beweist, daß die Reaktion von Tryptamin in Formaldehyd Voraussetzung für das Entstehen der von uns beobachteten fluoreszierenden Stoffe ist.
4. Versuch 4 (Fehlen fluoreszierender Verbindungen bei Tryptamin mit Formaldehyd ohne Lebergewebe) beweist die katalytische Funktion von Proteinen bzw. Aminosäuren bei der Entstehung der zu beobachtenden fluoreszierenden Stoffe.
5. Da biogene Amine obigen Typs in praktisch allen Organen in mehr oder weniger großen Konzentrationen vorhanden sind, besteht immer die Möglichkeit, daß sie sich bei der Formalinfixierung in die entsprechenden Isochinoline bzw. β -Carboline umwandeln.
6. Diese neu entstandenen Substanzen, die im weiteren Sinne körpereigene Verbindungen darstellen, können bei oberflächlicher Betrachtung der Ergebnisse toxikologischer Untersuchungen von formalinfixierten Organen mit Medikamenten bzw. Drogen,

die die Dihydroisochinolin- bzw. Dihydro- β -carbolin-Struktur besitzen, z.B. mit Chinin, verwechselt werden.

7. Es ist auch umgekehrt denkbar, daß Medikamente, die der Gruppe der β -Phenyl- bzw. β -(3 Indolyl)-äthylamine angehören, mit Formaldehyd reagieren und in der Analyse nicht mehr erkannt werden.

Literatur

- Björklund, A. Falck, B. Lindvall O, Svensson, L.: New aspects on reactions in the formaldehyde histofluorescence method for monoamines. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 17 (1973)
- Björklund, A. Falck, B.: Cytofluorometry of biogenic monoamines in the Falck-Hillarp method. Structural identification by spectral analysis. In: *Fluorescence Techniques* pp. 171–181 (Thaer and Sernetz, ed.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1973
- Corrodi, H., Hillarp, N.: Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 1. Identifizierung der fluoreszierenden Produkte aus Modellversuchen mit 6,7 – Dimethoxyisochinolinderivaten und Formaldehyd. *Helv. chim. Acta* **46**, 2425 (1963)
- Corrodi, H., Hillarp, N.: Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 2. Identifizierung des fluoreszierenden Produktes aus Dopamin und Formaldehyd. *Helv. chim. Acta* **47**, 911 (1964)
- Corrodi, H., Jonsson, G.: Fluorescence methods for the histochemical demonstration of monoamines. 4. Histochemical differentiation between dopamine and noradrenalin in models. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 484 (1965)
- Corrodi, H., Jonsson, G.: Fluoreszenz-Methoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 5. Identifizierung des fluoreszierenden Produktes aus Modellversuchen mit 5-Methoxytryptamin und Formaldehyd. *Acta Histochem. (Jena)* **22**, 247 (1965)
- Falck, B., Hillarp, N., Thieme, G., Torp, A.: Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 348 (1962)
- Jonsson, G.: Fluorescence methods for the histochemical demonstration of monoamines. 7. Fluorescence studies on biogenic monoamines and related compounds condensed with formaldehyde. *Acta chem. scand.* **20**, 2755 (1966)
- Jonsson, G.: Fluorescence studies on some 6,7 – substituted 3,4 – dihydroisoquinolines formed from 3 – hydroxytyramine (dopamine) and formaldehyde. *Histochemie* **8**, 288 (1967)
- Pictet, A., Spengler, T.: Über die Bildung von Isochinolin – Derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenylalanin und Tyrosin. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **44**, 2030 (1911)

Eingegangen am 11. Dezember 1975