
BACHELORARBEIT

Frau
Marie Röhnert

**Untersuchung des hämolyti-
schen Verhaltens alternder
Blutproben mit ausgewählten
Lösungsmitteln**

Mittweida, 2017

BACHELORARBEIT

Untersuchung des hämolytischen Verhaltens alternder Blutproben mit ausgewählten Lösungsmitteln

Autor:
Frau

Marie Röhnert

Studiengang:
Allgemeine und Digitale Forensik

Seminargruppe:
FO14w1-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Zweitprüfer:
M.Sc. Tommy Bergmann

Einreichung:
Mittweida, 11.09.2017

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2017

BACHELORTHESIS

Examination of the haemolytic behavior of aging blood sam- ples with selected solvents

author:

Ms.

Marie Röhnert

course of studies:

General and Digital Forensic Science

seminar group:

FO14w1-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

second examiner:

M.Sc. Tommy Bergmann

submission:

Mittweida, 11.09.2017

defence/ evaluation:

Mittweida, 2017

Bibliografische Angaben

Röhnert, Marie: Untersuchung des hämolytischen Verhaltens alternder Blutproben mit ausgewählten Lösungsmitteln, 49 Seiten, 14 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Bachelorarbeit, 2017

Referat

Die Untersuchung der Blutspuren am Tatort kann bei der Aufklärung eines Verbrechens hilfreich sein. Neben der Blutmusteranalyse, bei der Form und Verteilung von Blutspuren untersucht werden, ist auch die Blutaltersbestimmung fundamental, um den zeitlichen Ablauf einer Tat detailliert beschreiben zu können. Dafür sind im letzten Jahrhundert viele Methoden vorgestellt worden. Neben einer Farbskala für die Bestimmung des Blutalters vom Anfang des 20. Jahrhunderts gibt es heute mittlerweile computergestützte Ansätze, die jedoch meist sehr zeitaufwendig sind und eine schwere oder gar teure Ausrüstung benötigen. In dieser Arbeit sollte das hämolytische Verhalten alternder Blutproben mit drei ausgewählten Lösungsmitteln (destilliertes Wasser, Kochsalzlösung und Zitronensäure) untersucht werden. Dazu wurden 40 Messungen von präparierten Blutproben mit einem Spektroskop durchgeführt und ausgewertet. Für die Bestimmung des Blutalters wurden die Peaks des Oxyhämoglobins, bei 540 und 576 Nanometer, und die des Methämoglobins, bei 500 und 630 Nanometer, näher betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die Oxyhämoglobin-Peaks mit zunehmendem Blutalter abnehmen und die Methämoglobin-Peaks entsprechend zunehmen, bis die typischen Spitzen des Blutspektrums nicht mehr ersichtlich sind.

Abstract

The study of bloodstains at the crime scene can be helpful for crime scene investigations. In addition to blood pattern analysis, in which the shape and distribution of bloodstains are examined, the determination of the blood age is fundamental in order to be able to describe in detail the chronological sequence of a crime act. In the last century many methods were presented. Apart from a color scale for determining the age of the blood from the beginning of the twentieth century, there are now computer-based approaches which are usually very time consuming and require heavy or expensive equipment. In this work the hemolytic behavior of aging blood samples should be investigated with three selected solvents (distilled water, sodium chloride solution and citric acid). For this purpose, 40 measurements of prepared samples were performed and evaluated with a spectroscope. Then the peaks of oxyhemoglobin, at 540 and 576 nanometers and those of methemoglobin at 500 and 630 nanometers, were examined for determination of the blood age. It was observed the oxyhemoglobin peaks decrease with increasing blood age and the methaemoglobin peaks increase correspondingly until the typical peaks of the blood spectrum are no longer visible.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Blut	3
2.1.1 Funktionen	3
2.1.2 Bestandteile	4
2.1.2.1 Blutplasma	4
2.1.2.2 Leukozyten	5
2.1.2.3 Thrombozyten	6
2.1.2.4 Erythrozyten	7
2.1.3 Hämoglobin	8
2.1.4 Hämolyse	10
2.2 Schweineblut	12
2.3 Forensische Blutuntersuchungen	13
2.3.1 Blutmusteranalyse	13
2.3.2 Untersuchung des Blutalters	16
2.4 UV/VIS Spektroskopie	17
3 Material und Methoden	21
3.1 Blutproben	21
3.2 Spektralphotometrische Messungen	23
4 Ergebnisse	27
4.1 Spektralphotometrische Experimentreihen	27
4.2 Umwandlung der Hämoglobinderivate	32
5 Diskussion	37
Literaturverzeichnis	41

II. Abbildungsverzeichnis

2.1 Schematisch dargestellte Form der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten	5
2.2 Stechapfelform der Erythrozyten	8
2.3 Aktive und Passive Blutspuren	15
2.4 Bereich der elektromagnetischen Wellen	18
2.5 Geeignete Lösungen für bestimmte Wellenlängen	19
2.6 Das Absorptionsspektrum des Butes	20
3.1 Blutflecken auf Filterpapier	21
3.2 Spektralphotometer für die Experimente	24
4.1 Experimentreihe mit destilliertem Wasser	28
4.2 Experimentreihe des geschüttelten Blutes mit destilliertem Wasser	29
4.3 Experimentreihe mit Kochsalzlösung (NaCl)	30
4.4 Experimentreihe mit Zitronensäure	31
4.5 Darstellung der Verhältnisse der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks	34
4.6 Verhältnis der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks an drei ausgewählten Messzeit- punkten	35

III. Tabellenverzeichnis

3.1 Durchgeführte Messungen am ersten Tag der Blutalterung	23
3.2 Durchgeführte Messungen mit fortschreitendem Blutalter	25
4.1 Verhältnis der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks	32
4.2 Abweichung der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin an drei ausgewählten Zeitpunkten	36

IV. Abkürzungsverzeichnis

λ	griechisch: Lambda (Einheit der Wellenlänge), Seite 17
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Seite 1
Hb	Hämoglobin, Seite 7
HbO ₂	Oxyhämoglobin, Seite 7
HC	Hämichrom, Seite 9
MetHb	Methämoglobin, Seite 9
NaCl	Natriumchlorid oder Kochsalz, Seite 30
PET	Polyethylenterephthalat (Kunststoff), Seite 22
PMI	Postmortem-Intervall, Seite 2
UV	ultraviolettes Licht, Seite 17
VIS	sichtbares Licht, Seite 17

1 Einleitung

Schon im 19. Jahrhundert war bekannt, dass an einem Tatort viele Informationen, die bei der Aufklärung eines Falles helfen können, zu finden sind. Jedoch existieren bereits seit der Epoche der Antike die ersten forensischen Praktiken [42]. Das Fingerabdruckverfahren (Daktyloskopie) ist das wohl älteste bekannte biometrische Verfahren der Forensik. Schon 3.000 Jahre vor Christus zeichneten die Micmac-Indianer Handflächen mit Papillarlinienmustern in Stein. In Europa dagegen wurden die ersten daktyloskopischen Untersuchungen erstmals im Jahr 1686 von dem Italiener M. MALPHIGIUS beschrieben. Er fertigte zum Thema *Furchen und Muster der Handflächen* die ersten Schriften an. Der Tscheche J. E. PURKINJE stellte im Jahr 1823 die neun Grundmuster der Daktyloskopie vor, die auch heute noch die Grundlage von Tatortuntersuchungen bilden. Das Fingerabdruckverfahren wurde erstmals am 01.04.1903 in Deutschland eingeführt und von dem Dresdner Polizeipräsident P. KÖTTIG, der daktyloskopische Formeln für die Untersuchung der Fingerabdrücke am Tatort entwarf, fundiert. Die Daktyloskopie war damals nur mit Druckerschwärze möglich. Heute jedoch können Fingerabdrücke mit neuen Technologien aufgenommen und ausgewertet werden. [35]

Abgeleitet vom lateinischen Begriff für Marktplatz (*forum*, plural: *foren*), der im antiken Rom für Gerichtsverfahren, Untersuchungen, Urteilsverkündungen sowie deren Vollzug stand, ist die heutige Forensik die systematische wissenschaftliche und technische Untersuchung von kriminellen Handlungen. Die Forensik kann grob in folgende Teilgebiete gegliedert werden:

- Linguistik und Phonetik (Wissenschaft der geschriebenen und der gesprochenen Sprache),
- Toxikologie (Nachweis von Giften) und Serologie (Auswertung von Blutspuren, DNA und anderen Sekreten),
- Psychiatrie und Psychologie,
- Ballistik (Schusswaffen),
- Untersuchungen von Form- und Fingerabdruckspuren und
- IT-Forensik.

Dabei ist auch die Feststellung des Todeszeitpunktes eine fundamentale Grundlage für die Aufklärung einer Straftat. Es gibt verschiedene Methoden, dies umzusetzen; so zum Beispiel

durch Messen der Körpertemperatur. M. KALISZAN untersuchte die Zeitspanne zwischen dem Tod und dem Auffinden des Leichnams (Postmortem-Intervalls PMI) mit Hilfe der Augapfel- und Rektaltemperatur [21]. In einer weiteren Arbeit legte er dann den Schwerpunkt auf die Temperatur und das Auskühlen der Leiche [22]. Neben der Untersuchung der Körpertemperatur ist auch die Entomologie eine weit verbreitete Methode für die Feststellung des Todeszeitpunktes. Diese beschäftigt sich mit dem fortschreitenden Insektenbefall des Leichnams, wodurch die Leichenliegezeit bestimmt werden kann [11, 51].

Neben der Feststellung des Todeszeitpunktes hat die Analyse von Blutspuren eine besondere Bedeutung bei der Aufklärung einer Straftat. Sowohl die Blutmusteranalyse, die in Kapitel 2.3.1 näher erklärt wird, als auch die Bestimmung des Blutalters, siehe Kapitel 2.3.2, können dabei helfen, eine Tat aufzudecken.

In dieser Arbeit soll das hämolytische Verhalten alternder Blutproben mit drei ausgewählten Lösungsmitteln (destilliertes Wasser, Kochsalzlösung und Zitronensäure) untersucht werden. Außerdem werden spektroskopische Aufnahmen des Blutes von 40 präparierten Blutproben angefertigt. Dabei stellt sich die Frage, in welchem Umfang sich die verschiedenen Lösungsmittel auf den Prozess der Blutalterung und auf die Ergebnisse der spektroskopischen Analyse auswirken.

2 Grundlagen

2.1 Blut

Blut ist ein flüssiges Organ des Menschen, welches unter anderem Transport- und Krankheitserregerabwehr-Funktionen ausübt und die Temperaturregulation im Körper beeinflusst.

Ein erwachsener Mensch hat ein Blutvolumen von circa 3,5 bis 5,5 Liter im Körper. Dies entspricht in etwa sechs bis acht Prozent seines Körpergewichtes. Im Vergleich dazu weist ein jüngeres Kind ein Blutvolumen von circa acht bis neun Prozent seines Körpergewichtes auf. Der Normalwert der im Körper zirkulierenden Blutmenge wird als Normovolämie bezeichnet. Abweichungen hiervon nennt man Hypervolämie (Blutvermehrung) und Hypovolämie (Blutverminderung). [45]

2.1.1 Funktionen

Es gibt verschiedene Funktionen des Blutes.

Blut transportiert Zellen, Moleküle und weitere gelöste Stoffe, wie zum Beispiel Atemgase, vom Ort ihrer Aufnahme oder Lagerung hin zum Ort ihrer Notwendigkeit (ihrer Verwendung) und umgekehrt, zurück zum Ort des Ausscheidens. Dabei werden lebenswichtige Stoffe (Sauerstoff, Hormone, Vitamine, Mineralien) wie auch weniger wichtige Stoffe (Kohlendioxid, Fette, Gifte) im Körper transportiert und verteilt bzw. entsorgt.

Eine sehr große Bedeutung hat auch der Hauptbestandteil des Blutes, Wasser, welches aufgrund seiner hohen Wärmeaufnahmefähigkeit in der Lage ist, die im Stoffwechsel produzierte Wärme im Körper zur weiteren Abgabe über die Haut zu verteilen. Damit dient das Blut der Temperaturregulation im Körper.

Eine weitere Funktion des Blutes ist die Milieufunktion. Dabei werden die Zellen des Körper optimal mit lebenswichtigen Stoffen versorgt, damit der Körper funktionstüchtig erhalten bleibt.

Dies übernehmen bestimmte Organe im Körper, die über das Blut die Konzentration und die Funktionsfähigkeit der transportierten Stoffe kontrolliert. Dabei werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Blutes während seines Kreislaufs durch den Körper analysiert. Damit wird ein immerwährendes Gleichgewicht (Homöostase) angestrebt bzw. gewahrt.

Das Blut kann durch Stockung seiner Zirkulation bestehende Verletzungen abdichten und beschädigte Gefäße verschließen. Dabei unterscheiden sich die primäre Hämostase (Blutstillung) und sekundäre Hämostase (Blutgerinnung).

Eine weitere sehr wichtige Funktion des Blutes ist die Schutz- und Abwehrfunktion von körperschädlichen Stoffen, wie zum Beispiel Krankheitserreger. Diese werden durch bluteigene Proteine wie auch durch weiße Blutzellen zerstört. [45]

2.1.2 Bestandteile

Blut ist eine trüblich rote, nichtnewtonsche Flüssigkeit mit einer Temperatur von circa 37 Grad Celsius. Es besteht vorwiegend aus dem nicht-zellularem, gelblichen Blutplasma (circa 55 Prozent) sowie aus roten Blutzellen (Erythrozyten), weißen Blutzellen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thombozyten), den festen, zellularen Bestandteilen (circa 45 Prozent). Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Form der festen, zellularen Bestandteile.

Der ph-Wert des Blutes liegt bei ca. 7,4. [45]

2.1.2.1 Blutplasma

Das Blutplasma ist der nicht-zellulare Anteil des Blutes und macht etwa 55 Prozent des Blutes aus. Dies entspricht bei einem normalgewichtigen Erwachsenen circa drei Liter Plasma. In einem Liter Blutplasma befinden sich ungefähr 900 bis 910 Gramm Wasser, 65 bis 80 Gramm Proteine und 20 Gramm kleinmolekulare Stoffe.

Das Blutplasma hat eine hohe Blutgerinnungsfähigkeit (sekundäre Hämostase), wodurch der Körper vor hohem Blutverlust geschützt werden soll.

Die im Plasma gelösten Teilchen (Elektrolyte) sind für den osmotischen Druck des Blutplas-



Abbildung 2.1: **Schematisch dargestellte Form der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten**
Das Bild zeigt Leukozyten (unten links), Erythrozyten (oben) und Thrombozyten (unten rechts). [4]

mas zuständig, welcher für den Wasseraustausch zwischen Blutplasma und Organ-, Gewebe- oder Zellzwischenräumen (interstitieller Raum) verantwortlich ist. Bei vermehrter Wasserzufuhr können zelluläre Ödeme entstehen; Wasserverlust führt zum Schrumpfen der Zelle.

Die im Blutplasma enthaltenen Proteine, die nur einen geringen Anteil im Plasma ausmachen, übernehmen wichtige Funktionen innerhalb des Körpers. Zum einen sind sie für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich, welcher die Menge des auszutauschenden Wassers zwischen Blutplasma und interstitiellem Raum reguliert. Zum anderen dienen Proteine aufgrund ihres mehrbasigen Säurecharakters (Ampholyte) als Puffer, um den pH-Wert des Plasmas, der in Regel dem des Blutes identisch ist und 7,4 beträgt, im Gleichgewicht zu halten. Einige Proteine sind aufgrund ihrer hohen Dichte im Plasma besonders für den Transport von Stoffen, wie zum Beispiel des Wassers, geeignet. [45]

2.1.2.2 Leukozyten

Leukozyten, auch weiße Blutzellen genannt, besitzen einen Zellkern, jedoch kein Hämoglobin. Sie können aufgrund ihrer amöboiden Fähigkeit die Blutbahnen verlassen und wandern, angezogen von körpereigenen und krankhaften Stoffen, im Körper unmittelbar zu den Tatorten

von Krankheit und Infektion, um dort deren Erreger aufzunehmen und abzubauen. Somit sind Leukozyten für die Immunabwehr und die Bekämpfung von Krankheitserregern zuständig und wichtig.

Die Anzahl der Leukozyten im Körper verändert sich nach Tageszeit und Aktivität, aber auch bei Krankheit. Eine erhöhte Anzahl von Leukozyten (zum Beispiel bei Leukämie) nennt man Leukozytose, eine verminderte Leukopenie. Ein gesunder Erwachsener besitzt circa 7.000 Leukozyten pro Mikroliter Blut; bei Kleinkinder und Säuglinge beträgt die Anzahl circa 10.000 Stück pro Mikroliter Blut. Die größte Anzahl der Leukozyten (mehr als 50 Prozent) findet man außerhalb der Blutgefäße und mehr als 30 Prozent von ihnen sind im Knochenmark.

Unterschieden werden drei Arten von Leukozyten: die im Knochenmark mit Hilfe von Proteinhormonen gebildeten Granulozyten und Monozyten, sowie die Lymphozyten. Granulozyten, mit einer Verweildauer im Blut von circa 6 bis 12 Stunden, sind vor allem für die Abwehr von Krankheitskeimen verantwortlich. Sie lösen im Körper Entzündungen, Empfindlichkeitsreaktionen (wie zum Beispiel Allergien) und Schmerz sowie die Bildung von Antikörpern aus. Monozyten dagegen verweilen zwei bis drei Tage im Blut, um sich danach für mehrere Monate in verschiedenen Gewebeorten wie Milz, Lymphknoten oder Knochenmark einzunisten. Lymphozyten halten sich vorwiegend im Gewebe wie Lymphknoten und Milz auf und wehren Erreger durch zelleigene Antikörper ab. [45]

2.1.2.3 Thrombozyten

Die Blutplättchen (Thrombozyten) besitzen im Gegensatz zu den Leukozyten keinen Zellkern. Sie sind kleine, unregelmäßig geformte Plättchen, die zwischen einem und vier Mikrometer lang und weniger als ein Mikrometer dick sind. Die Thrombozyten werden ebenfalls im Knochenmark durch Abschnürung von Membranabschnitten einer im Knochenmark lebenden Riesenzelle gebildet, befinden sich zwischen fünf und elf Tagen in der Blutbahn des Menschen und werden dann in Lunge, Leber oder Milz abgebaut.

Ein erwachsener Mensch hat durchschnittlich 150.000 bis 400.000 Thrombozyten pro Mikroliter Blut. Vermindert sich diese Anzahl an Thrombozyten, zum Beispiel durch Störungen in ihrer Produktion oder durch Blutverlust, kann ein Blutplättchenmangel (Thrombozytopenie) entstehen. Es kommt zu gesteigerten Blutungsneigungen im Körper, die starke und plötzlich auftretende Blutungen in Gefäßen und Organen nach sich ziehen können. Durch den Mangel

an Thrombozyten wird die primäre Hämostase (Blutstillung) erschwert. [45]

2.1.2.4 Erythrozyten

Den wohl größten Anteil im Blut haben die roten Blutzellen, die Erythrozyten. Ein erwachsener Mann besitzt etwa 5,1 Millionen pro Mikroliter Blut (dies entspricht in etwa 44 bis 46 Prozent vom Blut); eine erwachsene Frau hat ungefähr 4,6 Millionen. Mit zunehmender Anzahl von roten Blutkörperchen nimmt die Blutviskosität (Fließeigenschaft beziehungsweise Zähflüssigkeit des Blutes) überproportional zu. Der Anteil der Erythrozyten im Blut wird Hämatokrit genannt.

Erythrozyten werden im Knochenmark gebildet, verbleiben zwischen 100 und 120 Tagen in der Blutbahn, um dann im Knochenmark sowie in Leber und Milz abgebaut zu werden. Alte und abgebaute Zellen werden durch neue, junge Zellen ersetzt. Diesen Vorgang, der circa 24 Stunden dauert, nennt man Hämatopoiese.

Geregelt wird die Bildung der Erythrozyten von dem größtenteils aus der Niere, manchmal aus Leber oder Gehirn stammenden Hormon Erythropoietin. Die Anzahl dieses Hormons kann unter anormalen Umständen, wie zum Beispiel Blutverlusten oder Krankheiten, enorm ansteigen, was eine vermehrte oder eine verminderte Bildung der Erythrozyten (Anämie) zur Folge hat. Beim Abbau nicht mehr verwendeter Erythrozyten wird Eisen freigesetzt, welches nach dem Abtransport zum Knochenmark unmittelbar zur Neubildung des Hämoglobins (Hb) verwendet wird.

Erythrozyten bestehen aus Wasser sowie dem roten Blutfarbstoff Hämoglobin, einem eisenhaltigen Protein, welches für den Atemgastransport zwischen Lunge und Gewebe verantwortlich ist. Dabei können sich unter gewissen Umständen Sauerstoff- und Kohlendioxidmoleküle an das Hämoglobin binden. Steigt zum Beispiel der pH-Wert des Blutes oder kühlt dieses stark ab, wächst die Fähigkeit des Hämoglobin zur Bindung von Sauerstoff. Außerdem fördert die flache Form der Erythrozyten durch die Vergrößerung ihrer Oberfläche den Atemgasaus-tausch. Hämoglobin mit Sauerstoffanbindung, also auf dem Weg zur Lunge, nennt man Oxyhämoglobin (HbO_2); solches ohne Sauerstoffanbindung, also auf dem Weg zurück von der Lunge, nennt man Deoxyhämoglobin.

Erythrozyten sind zellkernlos und haben einen mittleren Durchmesser von etwa 7,5 Mikrometer.

Wie in Abbildung 2.1 zu erkennen, haben Erythrozyten aufgrund von den an der Erythrozytenmembran verankerten Strukturproteinen die Fähigkeit, sich entsprechend der Fließgeschwindigkeit des Blutes zu verformen, um so auch die kleinsten oder gekrümmte Gefäße durchlaufen zu können. Je jünger ein Erythrozyt ist, desto biegsamer ist sein Zellkörper. Genetische Anomalien der Strukturproteine führt zur Zerstörung der Zellmembran und somit zur Auflösung der Erythrozyten (Hämolyse).

Eine besondere Verformung von Erythrozyten ist die Stechapfelform (Abbildung 2.2). Ursache hierfür ist unter anderem der Wasserverlust der Erythrozyten im hypertonen Medium und die damit einhergehende Faltung ihrer Membran. Dagegen im hypotonen Medium mutieren Erythrozyten zur Kugelform, deren Membrane platzen können und somit Hämoglobin freigegeben wird (osmotische Hämolyse). [45]

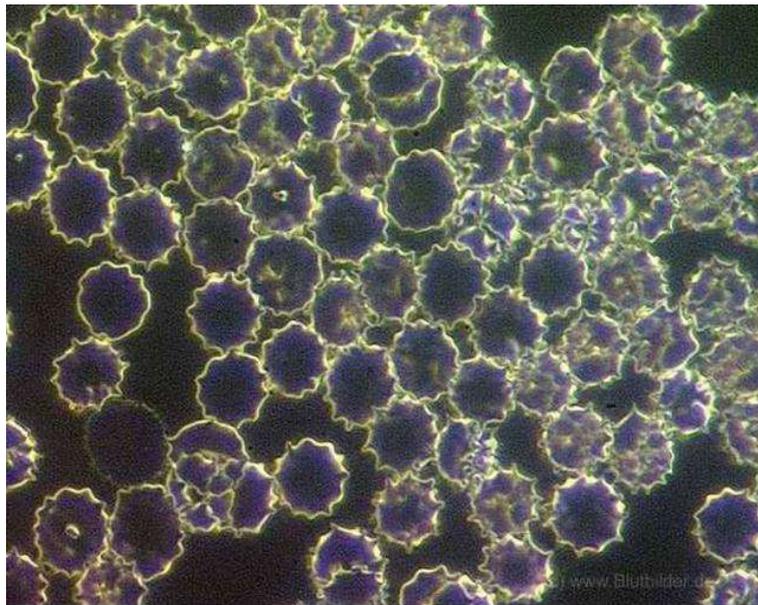


Abbildung 2.2: **Stechapfelform der Erythrozyten**
Mikroskopische Aufnahme der Stechapfelform mit einer 1200-fachen Vergrößerung.
[43]

2.1.3 Hämoglobin

Nach der Lebensdauer der Erythrozyten von 100 bis 120 Tagen werden diese abgebaut. Dabei wird das darin befindliche Hämoglobin freigesetzt und ebenfalls abgebaut.

Hämoglobin ist der rote, sauerstoffbindende Blutfarbstoff der Erythrozyten. Je nach Sauerstoffgehalt und Oxidationszeit hat Blut somit die Farben hellrot bis dunkelbraun. Der Farbgehalt des Blutes hängt schlussfolgernd vom Hämoglobin ab. Die mittlere Hämoglobinkonzentration eines erwachsenen Mannes beträgt circa 155 Gramm pro Liter Blut und die einer Frau circa 140 Gramm pro Liter.

Hämoglobin setzt sich unter anderem aus dem sauerstoffbindenden Häm (Eisen-Ion-Porphyrin-Molekül Komplexverbindung) und dem Protein Globin zusammen. Sowohl Sauerstoffmoleküle als auch Kohlenstoffdioxidmoleküle sind in der Lage, sich an das Hämoglobin zu binden. Hämoglobin kann in verschiedenen Formen auftreten, die auch Hämoglobinderivate genannt werden. Die Umwandlung dieser Derivate *in vivo* (im lebendigen Organismus) verläuft anders als *ex vivo* (außerhalb des Organismus).

Im Organismus liegt Blut meist in zwei Formen vor: das sauerstoffreiche Oxyhämoglobin und das sauerstoffarme Deoxyhämoglobin. Ein kleinerer Teil des Hämoglobins kann sich durch Oxidation der Eisenatome in eine dritte Form wandeln, das Methämoglobin (MetHb). Methämoglobin ist durch seinen erhöhten Eisenatomwert nicht in der Lage, Sauerstoff zu binden. Ein steigender Methämoglobinanteil im Blut kann zu Sauerstoffmangel führen, welcher sich von Kopfschmerzen bis hin zur Bewusstlosigkeit oder sogar dem Tod auswirkt. Das Enzym Methämoglobin-Reduktase, Cytochrom B5, kontrolliert den Anteil des Methämoglobins im Blut und verwandelt dieses zurück in Deoxyhämoglobin. Im Körper befindet sich Hämoglobin also entweder als oxigeniertes Hämoglobin auf dem Weg von der Lunge zu den Organen oder als deoxigeniertes auf dem Weg zurück zur Lunge.

Im Gegensatz dazu verhält sich Blut, das sich nicht mehr im Organismus befindet (*ex vivo*), anders. *Ex vivo* wird das gesamte Hämoglobin nach und nach in Oxyhämoglobin umgewandelt, da es den Sauerstoff, der sich in der Umgebung befindet, unmittelbar aufnimmt, und oxidiert schließlich zu Methämoglobin. Da das Enzym Methämoglobin-Reduktase nun nicht mehr vorhanden ist, kann eine Rückwandlung des Methämoglobins zu Deoxyhämoglobin nicht erfolgen. Durch Denaturierung (strukturelle Zellveränderung) und den damit einhergehenden Oxidationsvorgang des Blutes entsteht dessen farbliche Veränderung von hellrot (Oxyhämoglobin) in dunkelbraun (Methämoglobin) bis hin zu schwarz (Hämichrom)(HC). [45] [2] [3]

2.1.4 Hämolyse

Wie in Kapitel 2.1.2.4 erwähnt, haben die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten, eine Lebensdauer von 100 bis 120 Tagen. Durch Zerstörung des Erythrozytes *in vivo* oder *ex vivo* kann dessen Lebenszeit auf weniger als 100 Tage verkürzt werden [57]. Dieser Zerstörungsmechanismus wird als Hämolyse bezeichnet. Durch die Hämolyse kann das Hämoglobin austreten und in das Blutplasma gelangen [54]. M. VEST berechnete in seiner Arbeit, dass etwa drei Millionen rote Blutkörperchen pro Sekunde eingehen oder zerstört werden [59].

Durch den beschleunigten Abbau der Erythrozyten können hämolytische Erkrankungen, wie zum Beispiel die hämolytische Anämie (Blutarmut), auftreten. Das Knochenmark kann in diesem Fall den raschen und vermehrten Zerfall der roten Blutkörperchen nicht mehr kompensieren. [57]

Neben der hämolytischen Anämie kann ebenso die Hämoglobinurie auftreten. Sobald der Anteil von Hämoglobin im Blut durch eine massive Hämolyse enorm ansteigt, kann es vorkommen, dass dieses durch den Harn ausgeschieden wird [18].

Die Hämolyse kann durch verschiedene Gründe ausgelöst werden. Das sind beispielsweise

- mechanische Einflüsse,
- strahlende Energie,
- enorme Temperaturveränderungen,
- osmotische Druckdifferenzen,
- tierische oder bakterielle Gifte,
- Membranschädigungen der Erythrozyten,
- chemische Einflüsse oder
- Schädigung durch Ultraschall.

Die Hämolyse kann durch zu hohe mechanische Einflüsse, die auf die Zellmembran wirken, ausgelöst werden. Es kann vorkommen, dass sich die Poren der Blutzellmembran vergrößern, womit das Hämoglobin austreten und in das Blutplasma fließen kann. Das Erythrozyt kann anschließend zwar seine Ursprungsform wieder annehmen, besitzt jedoch einen niedrigeren Hämoglobingehalt, da das Hämoglobin zum Teil abgegeben wurde. Ist die mechanische Belastung zu groß, reißt die Zelle auf und gibt den gesamten Inhalt an das Plasma ab. O. SONNTAG untersuchte das Ausmaß dieser Zerstörungen im Jahre 1986. [52]

P. HÁRI erklärte, dass es ebenso möglich sei, das Erythrozyt ex vivo mit Quarzsand zu verreiben, um die Hämolyse auszulösen [18]. In vivo kann es vorkommen, dass das Erythrozyt bei der Zirkulation des Blutes zerstört oder beschädigt wird [59].

Durch erhöhte Sonnenbestrahlung, künstliche Bestrahlung oder auch durch Röntgen- oder Radiumbestrahlung kann das rote Blutkörperchen ebenso geschädigt und die Hämolyse ausgelöst werden [6]. Dabei erhitzt sich die Zelle durch enorme Lichtbestrahlung und kann platzen. Die Erhitzung durch Lichteinfluss kann als eine thermische Schädigung angesehen werden. [52] Eine weitere thermische Schädigung und somit eine weitere Ursache für die Hämolyse ist das wiederholte Gefrieren und Auftauen von Blut, wodurch die Zelle beschädigt und Hämoglobin abgeben werden kann [18]. 2006 wurde der Einfluss der thermischen Schädigung durch einen Nacht-Gefrier-Tau-Zyklus durch G. LIPPI untersucht [34].

Eine weitere Ursache für die Hämolyse sind osmotische Druckdifferenzen des Blutes. Dabei wird der Blutzellendruck durch hypertone (höherer osmotischer Druck als der des Blutes) oder auch hypotone Flüssigkeiten (niedriger osmotischer Druck als der des Blutes) aus dem Gleichgewicht gebracht. Sobald die Blutzelle mit einer hypotonen Flüssigkeit in Berührung kommt, nimmt diese unter Volumenzunahme Wasser auf. Die hypertone Flüssigkeit dagegen bewirkt das Gegenteil; die Zelle gibt unter Volumenabnahme Wasser ab. Mit einer isotonen Flüssigkeit, zum Beispiel einer 0,9 prozentigen Kochsalzlösung, bleibt die Zelle unverändert und nimmt weder Wasser auf noch gibt sie welches ab. [18, 31, 54]

Die Hämolyse kann auch sowohl durch tierische und bakterielle Gifte, wie zum Beispiel Schlangengifte, oder auch durch chemische Schädigungen des Erythrozyts ausgelöst werden [6].

M. W. MILLER et. al. untersuchten im Jahr 2000 eine weitere Ursache der Hämolyse, die Beschädigung des roten Blutkörperchens durch Ultraschall [36].

Laut P. HÁRI besitzen die roten Blutkörperchen das Verlangen, dem Drang der Hämolyse zu widerstehen, welcher sich *Resistenz* nennt [18].

2013 entwickelten D. SAKOTA und seine Kollegen die Plasmaoberflächenreflektionsspektroskopie, mit der es möglich war, den Hämatokrit von hämolysierten Blut außerhalb des Organismus zu bestimmen. [40]

2.2 Schweineblut

Das bei meinem Experiment verwendete Schweineblut wurde bei der Fleischerei Richter in Mittweida erworben. Es war zum Zeitpunkt des Kaufes circa 24 Stunden alt und laut der Verkäuferin der Fleischerei frei von Zusätzen. In forensischen Untersuchungen werden oft Schweine verwendet, da sie Gemeinsamkeiten mit Menschen in Größe, Gewicht und Anatomie zeigen.

Eine Arbeit aus Tennessee, Knoxville, untersuchte beispielsweise, ob Schweinekörper ein gutes Ersatzmittel für menschliche Leichen wären. Dafür wurden sowohl auf Menschen- als auch auf Schweinekadavern Fliegen- und Käferpopulationen beobachtet. Man kam zu dem Entschluss, dass ein Schweinekörper mit einem Gewicht von 23 bis 27 Kilogramm ein guter Ersatz für menschliche Leichen sei. [47]

Neben der Ähnlichkeit in Anatomie und Körperbau ist der Hämoglobingehalt ein weiteres wichtiges Vergleichsmittel zwischen Schweine- und Menschenblut. P. RONA und H. KLEIMANN untersuchten schon im Jahr 1929 das Blut von Menschen, Schweinen, Hunden, Rindern, Pferden, Schafen, Kaninchen und Ziegen [39]. Nachdem von allen genannten Säugetieren Blutproben entnommen wurden, haben H. KLEIMANN und P. RONA den mittleren absoluten Hämoglobingehalt berechnet. Es wurde herausgefunden, dass dieser beim Menschen $32,5 \times 10^{-12}$ Gramm und beim Schwein 22×10^{-12} Gramm beträgt. Der Hämoglobingehalt des Hundes liegt mit 24×10^{-12} Gramm zwar näher an dem des Menschen, jedoch kam dieses Blut für mich für die Durchführung der Experimente nicht in Frage. Rinder (19×10^{-12} Gramm), Schafe (11×10^{-12} Gramm), Kaninchen (20×10^{-12} Gramm), Pferde (18×10^{-12} Gramm) und Ziegen (7×10^{-12} Gramm) besitzen einen zu sehr abweichenden, mittleren absoluten Hämoglobingehalt und kommen daher für derartige Untersuchungen nicht in Frage.

Da das Schwein Gemeinsamkeiten in Körperbau und Anatomie zum Menschen aufweist [47, 48] und der berechnete, mittlere absolute Hämoglobingehalt annähernd dem des Menschen entspricht [39], ist es möglich, dieses Säugetier zu Forschungszwecken zu verwenden, um sowohl den menschlichen Körper als auch sein Blut in Experimenten zu ersetzen.

2.3 Forensische Blutuntersuchungen

Die Forensik untersucht kriminelle Handlungen und ist in verschiedene Teilgebiete untergliedert, die alle für sich unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zu den Teilgebieten gehören unter anderem die Rechtsmedizin, die sich neben der forensischen Traumatologie auch mit der Entomologie und Osteologie (Knochenlehre) beschäftigt, und die forensische Linguistik, die sich auf die geschriebene Sprache spezialisiert hat. Die forensische Phonetik untersucht, im Gegensatz zur Linguistik, die gesprochene Sprache. Außerdem gehören die forensische Toxikologie und Serologie, die sich unter anderem mit dem Nachweis von Giften auseinandersetzen, die Computerforensik, die Psychiatrie und Psychologie sowie die Ballistik, bei der sich alles um Schusswaffen dreht, zum Gebiet der Forensik. Neben Untersuchungen von Form- und Fingerabdruckspuren ist die Analyse von körpereigenen Materialien, wie zum Beispiel Speichel, Urin, Haare, Blut und anderes, fundamental.

Durch die Analyse des körpereigenen Materials Blut kann unter anderem das Alter von Blutspuren untersucht werden. Um ein Verbrechen rekonstruieren und die Blutspuren interpretieren zu können, wird die Blutmusteranalyse angewendet [16].

2.3.1 Blutmusteranalyse

Neben der Analyse des Alters ist es auch möglich, das Muster von Blutspuren zu untersuchen. Die Blutmusteranalyse versteht sich als ein medizinisch-kriminalistisches Teilgebiet der Forensik und beschäftigt sich mit der Untersuchung und Interpretation von Blutspuren. Zentrale Fragen können mithilfe der Blutmusteranalyse gegebenenfalls geklärt werden. Dazu gehören zum Beispiel:

- Wo ist die Tat geschehen?
- Was ist vorgefallen?
- Wann ist es passiert?
- War es ein Tötungsdelikt, Suizid oder Unfall?

Die Entwicklung unterschiedlicher Methoden und Verfahren zur Blutmusteranalyse ist ein klassisches Problem im Bereich der Forensik. Die ersten Untersuchungen zu Form und Verteilung von Blutspuren wurden schon vor über 100 Jahren, Ende des 19. Jahrhunderts, im Wiener

Institut für Gerichtliche Medizin durchgeführt. [16]

Bevor man mit Hilfe der Morphologie von Blutspuren den Tatort rekonstruieren will, sollte man sich den Unterschied zwischen aktiven und passiven Entstehungsformen von Blutspuren klar machen (Abbildung 2.3) [27]. Neben dem Blutpool, bei dem sich mehrere Blutropfen vereinigen, zählen auch die Fließspuren zu den passiven Blutspuren. Diese rinnen beispielsweise von einem Gegenstand oder Körperteil in Richtung Boden. Eine Transferspur, die ebenfalls eine passive Blutspur ist, wird unter anderem von blutgetränkten Socken oder Schuhen auf einen Untergrund übertragen. Passive Spuren werden nicht von einem Spurenverursacher herbeigeführt.

Daneben gibt es auch aktive Blutspuren. Dazu gehören Schleuderspuren, Schlagspritzspuren, Ausatemspuren, Kontaktsuren und Backspatterspuren. Sie werden auch projizierte Spuren genannt, da sie durch Eigenbeschleunigung des Blutes entstehen. Die Backspatterspur nennt man auch Hochgeschwindigkeitsspur. Sie bildet sich bei einer Wunde, verursacht durch eine Schusswaffe.

Viele Studien beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Analyse von Blutspuren. Eine Arbeit von TH. DE CASTRO, T. NICKSON, D. CARR und C. KNOCK befasste sich mit der Interpretation von Blutspuren auf Bekleidungsstoffen [12]. Darin wurde das Verhalten von Blut auf zwei Baumwollstoffen untersucht und Experimente dazu durchgeführt. Die Studie zielte darauf ab, Auswirkungen der Fallhöhe und unterschiedlicher Gewebetypen von Stoffen beim Auftreffen von Blutropfen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Studie waren vielversprechend, jedoch wurden die folgenden Punkte nicht in Betracht gezogen:

- die Folgen vieler weiterer Tropfhöhen,
- der Effekt von Gewebestrukturen und
- die Wirkung von größeren Tropfen bei der Übertragung auf weitere Stoffe.

Das Team von A. E. DONALDSON erklärte, dass sich viele forensische Ermittler mit den unterschiedlichen Formen, Größen und Verteilungen von Blutspuren auseinandersetzen. Um die eigene Interpretation zu unterstützen, sollte man, wenn möglich, medizinische Forschungsergebnisse über Verletzungen zu Rate ziehen. In Fällen, in denen ein Opfer nicht gefunden

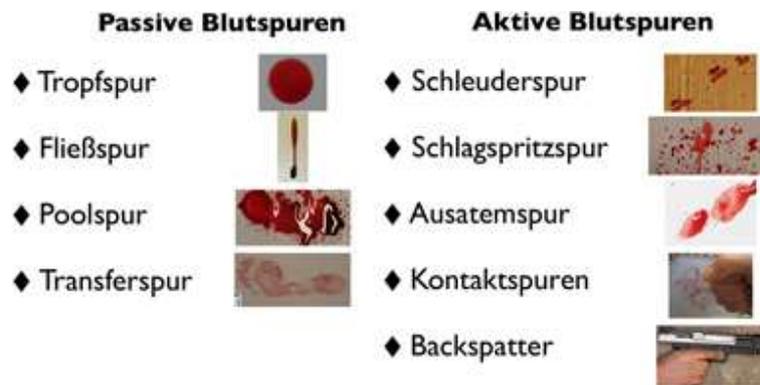


Abbildung 2.3: **Aktive und Passive Blutspuren**

Das Bild zeigt die unterschiedlichen Formen der Blutspuren, gegliedert in Aktive und Passive. [27]

wird, der Körper verwest oder nur Teile von Blutspuren auf der Kleidung vorhanden sind, ist es wichtig, den ganzen Umfang des Blutmusters aufzeigen zu können. Deshalb sollte man die wesentlichen charakteristischen Merkmale von Blut und Blutmustern kennen, um eine verlässliche Schlussfolgerung geben zu können. In diesem Sinne beschäftigten sie sich mit drei Arten des Blutaustritts, aus Mund und Nase, durch Husten, Spucken und Atmen. Zu jeder dieser Arten wurden unterschiedlich viele Experimente durchgeführt und mit einer Videokamera aufgezeichnet, um herauszufinden, ob man zwischen den Spuren unterscheiden kann. Die Videoaufnahmen zeigten, dass physikalische Eigenschaften, wie tropfenartige Spuren und blasenartige Ringe während des Ausatmens produziert werden und daher hilfreich für die Identifikation von Spuren aus dem Mund sind. Jedoch ist bei der Interpretation von Tropfspuren Vorsicht geboten, da sie zum Beispiel auf Stoffen durch Absorption nicht mehr richtig zu sehen sein könnten. [13]

M. KETTNER et.al. erforschten in ihrer Arbeit die Auswirkungen von Höhe und Wandabstand auf die Blutmusteranalyse. Es wurden drei Experimentserien gemacht, in denen ein Hammerkopf in einen Blutpool fiel. In jeder Serie wurde der Abstand von der Einschlagstelle bis zur Wand vergrößert (von 0,3 Meter bis 1,5 Meter). In Serie eins und zwei wurde der Hammerkopf in einen, unmittelbar auf den Tisch getropften Blutpool fallengelassen. In Serie drei jedoch wurde der Hammer in eine becherartige Petrischale, die mit dem Blut gefüllt war, abgeworfen. Während der Experimente wurde mit einer Kamera fotografiert und anschließend mit einer Software ausgewertet. Es konnte dabei folgendes festgestellt werden: je höher die Ausgangsposition des Hammerkopfes, desto größer sind die Blutropfen, die von der Einschlagstelle an die Wand projiziert werden. [23]

2.3.2 Untersuchung des Blutalters

Die Bestimmung des Blutalters ist ein wichtiger Ansatz, um eine Tatzeit einzugrenzen. Im Laufe der Jahre wurden viele Möglichkeiten vorgestellt, um das Alter eines Blutflecks zu bestimmen. Schon im Jahr 1907 stellte L. TOMELLINI in seiner Arbeit eine Farbskala vor, mit der man die unterschiedlichen Stadien der Blutalterung ablesen konnte [55]. Im Jahre 1930 wurde von SCHWARZACHER der Einfluss von Gips und Rost auf die Alterung der Blutflecken untersucht [46]. Dabei testete er luftgetrocknete Blutflecken auf unterschiedlichen Materialien, die im Sonnenlicht oder mit einer Quarz-Quecksilberlampe getrocknet wurden.

Die Konzentrationsbestimmung von Blut (Kolimetrie) und die damit einhergehende Farbveränderung mit voranschreitender Zeit wurde von D. PATTERSON 1960 untersucht [37]. Bei einer Raumtemperatur von 18 Grad Celcius wurden die Blutflecken im Dunkeln getrocknet.

D. PATTERSON erkannte, dass sich sowohl Temperatur als auch Feuchtigkeit und Beleuchtung auf die Farbveränderungen von Blut auswirken. Am Ende der Experimente konnten jedoch nicht genügend Ergebnisse für eindeutige Bestimmungen gesammelt werden.

Untersuchungen mit einem Spektrophotometer wurden 1972 von S. S. KIND, D. PATTERSON und G. W. OWEN gemacht [24]. Sie analysierten sichtbare Absorptionsspektren von getrockneten Blutflecken. Dabei sollte eine zeit- und temperaturabhängige Menge, die als *Alpha-Verhältnis* bezeichnet wird, abgeleitet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Substanz Blut eindeutig bestimmt und dadurch das Alter des Flecks abgeleitet werden konnte. Einen ähnlichen Ansatz hatten im darauffolgenden Jahr S. S. KIND und M. WATSON [25].

Diese Arbeit und die von E. KLEIHAUER, G. STEIN und G. SCHMIDT [26] wurden im Jahr 1977 verglichen. Bei beiden wurde das Blutfleckalter mit Hilfe eines Spektrophotometers untersucht und bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die verwendeten Blutkonzentrationen zu sehr schwankten, sodass die Alterung des Blutflecks nicht exakt bestimmt werden konnte.
Laut

U. KÖHLER und I. OEPEN konnten beide Arbeiten nicht in der Praxis umgesetzt werden, da die Altersbestimmung um mehrere Wochen schwankte. [28]

Neben der Spektrophotometrie ist es auch möglich, das Alter der Blutflecken mittels Atomkraftmikroskopie zu bestimmen, wie es im Jahr 2007 S. STRASSER und Kollegen versuchten [53]. Durch hochauflösende Bildgebung der roten Blutkörperchen konnte keine morpholo-

gische Veränderung der Blutflecken zwischen dem ersten und dem 31. Tag nach Trocknung festgestellt werden. S. STRASSER stellte jedoch fest, dass die Elastizität des Blutes mit dem Alter abnimmt. Im Jahr 2010 stellten E. K. HANSON und J. BALLANTYNE die Ergebnisse ihrer Studie vor, mit denen es nun möglich war, am Tatort mit einem tragbaren Spektrophotometer eine Altersbestimmung vorzunehmen [17].

Im Jahre 2012 stellten R. H. BREMMER und seine Kollegen ein Paper vor, welches die Techniken der Altersbestimmung zusammenfasste [7]. Sie zeigten auf, dass es unterschiedliche Methoden der Altersbestimmung für rote und weiße Blutkörperchen sowie für Blutplasma gibt. Neben der Reflexionsspektroskopie, die auf der Farbe des Reflexionsspektrums basiert [8, 17, 24, 28, 33, 37], ist es auch möglich, die Veränderungen im Nahinfrarotbereich [14, 29] zu beobachten oder die hyperspektrale Bildgebung [9, 15, 32] zu nutzen. Weitere Methoden sind die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, die unter anderem von H. INOUE [20] oder J. ANDRASKO [1] untersucht wurde, oder die Elektronenspinresonanz [41].

Im Mai 2017 stellten T. BERGMANN, F. HEINKE und D. LABUDDE ihre Arbeit vor, in der sie das Alter von Blutflecken (zwei Stunden bis drei Wochen) anhand von Absorptionsspektren schätzten [5]. Die Datenverarbeitung wurde mit Hilfe einer k-nächster-Nachbarn-Klassifikation gemacht. J. SHIN und seine Kollegen haben ein mobiles Detektionssystem mit dem Namen *Smart Forensic Phone* entwickelt, mit dem das Alter von Blutflecken unmittelbar am Tatort und ohne weitere Hilfsmittel, außer einem Smartphone, untersucht werden kann. Momentan kann somit ein bis zu 42 Stunden altes Blut geschätzt werden [50].

2.4 UV/VIS Spektroskopie

Für die Untersuchung des hämolytischen Verhaltens alternder Blutproben in dieser Arbeit wurde die UV/VIS Spektroskopie verwendet. Diese nutzt die elektromagnetischen Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren (VIS) Lichts und wird auch UV/VIS Spektralphotometrie oder Spektrophotometrie genannt.

Licht selbst ist eine elektromagnetische Strahlung und umfasst unter anderem Röntgenstrahlung, ultraviolettes, sichtbares und infrarotes Licht sowie Funkwellen. Das Licht einer Lichtquelle besteht aus einer Mischung unterschiedlicher Wellenlängen. Die Wellenlänge ist dabei die Länge einer einzelnen Schwingung und wird mit λ dargestellt. Sie deckt den Bereich des

ultravioletten bis sichtbaren Lichtes ab. Abbildung 2.4 zeigt den Bereich der elektromagnetischen Wellen.

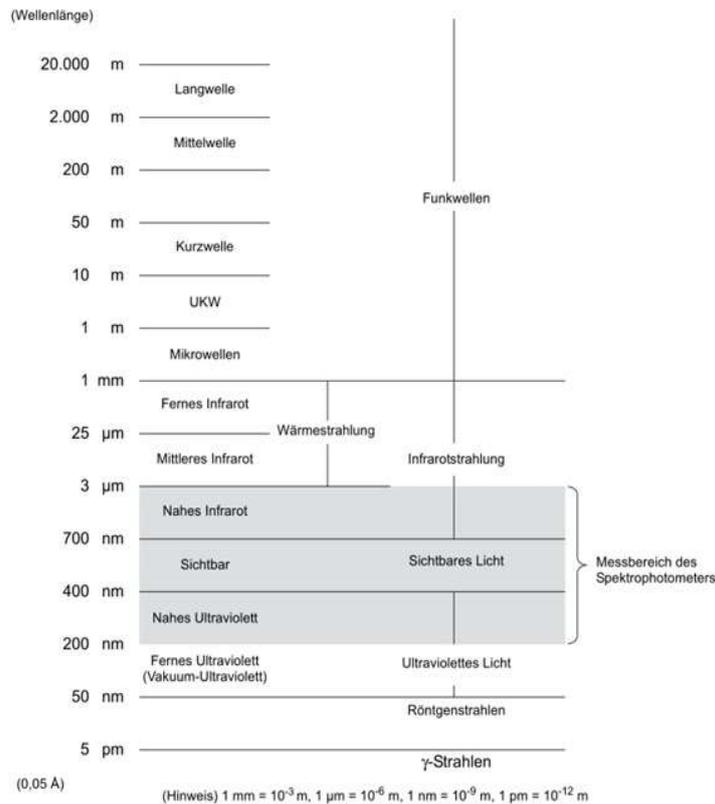


Abbildung 2.4: **Bereich der elektromagnetischen Wellen**

In dieser Abbildung sieht man den Bereich der elektromagnetischen Wellen. Dieser reicht von γ -Strahlen bis hin zu langwelligeren Funkwellen. [49]

Ein Spektralphotometer kann sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse von Lösungen durchführen. Mit der qualitativen Analyse können die Substanzen der Lösungen und deren Bestandteile bestimmt werden. Die quantitative Analyse dagegen ermittelt die Menge der Substanzen, aus denen eine Lösung besteht. Diese wird auch kolorimetrische Analyse genannt. Um eine Probe der Lösung bestimmen zu können, wird diese in einem Lösungsmittel aufgelöst. Die Auswahl der Lösungen ist dabei sehr wichtig. Beispiele für geeignete Lösungsmittel, die teilweise nur für bestimmte Wellenlängenmessungen genutzt werden können, werden in Abbildung 2.5 aufgezeigt. [30, 58]

Laut H. KLEIMANN und P. RONA nutzt man Absorptionsspektren um biologische Farbstoffe genauer untersuchen zu können. Die Absorptionsspektren sind dabei unter anderem abhängig von der Art des angewandten Lösungsmittels. Die größten Unterschiede der Spektren treten

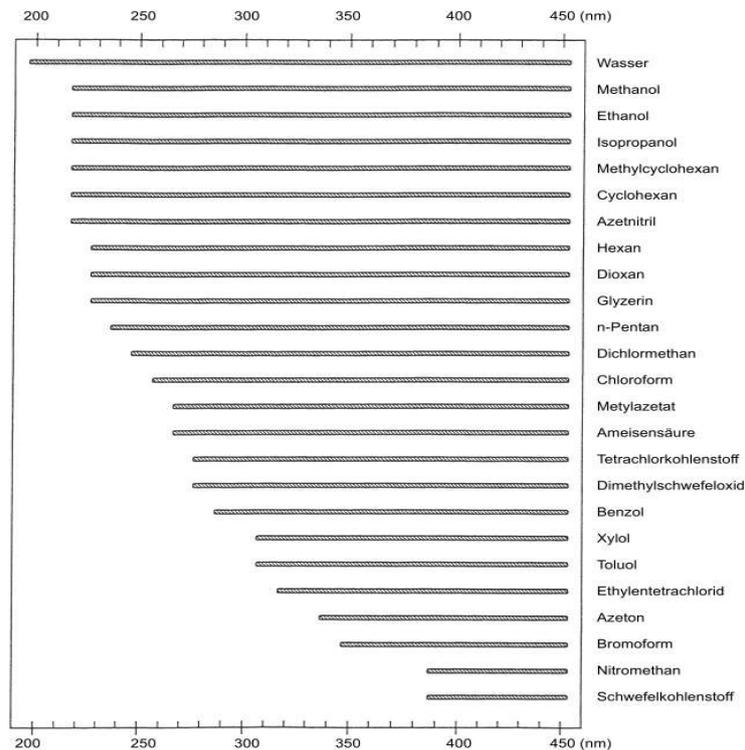


Abbildung 2.5: **Geeignete Lösungen für bestimmte Wellenlängen**

Die Abbildung zeigt eine Reihe von Lösungen, die teilweise nur für bestimmte Wellenlängenmessungen genutzt werden können. [49]

meist zwischen alkoholischen, wässrigen, sauren oder alkalischen Lösungen auf. Außerdem ist die Konzentration des Farbstoffs entscheidend. Das Spektrum ist stark durch die Konzentration der Lösung, die von dem Licht durchleuchtet wird, abhängig. Auch die Schichtdicke des zu untersuchenden Materials ist essentiell. Sind die Lösungen stark verdünnt, können die Absorptionsspektren genauer ausfallen. Ebenso wichtig ist die Art des Spektralphotometers. Ein solches Gerät mit starker Dispersion kann Absorptionsspektren unscharf und verwaschen erscheinen lassen. Ein Spektralphotometer mit geringer Dispersion dagegen wird dieses Spektrum schärfer und dunkler darstellen. [39]

Das Spektrum des Blutes weist Merkmale auf, die bei der Altersschätzung hilfreich sein können. Das sind die typischen Peaks bei 540 und 576 Nanometer, die auf das Oxyhämoglobin hinweisen, die Peaks des Methämoglobins bei 500 und 630 Nanometer und die Soret-Bande, die zwischen 400 und 425 Nanometer verläuft (Abbildung 2.6). Mit zunehmendem Blutalter nehmen aufgrund der Oxidation des Blutes die Spitzen des Oxyhämoglobins ab und die des Methämoglobins steigen an. [17, 24]

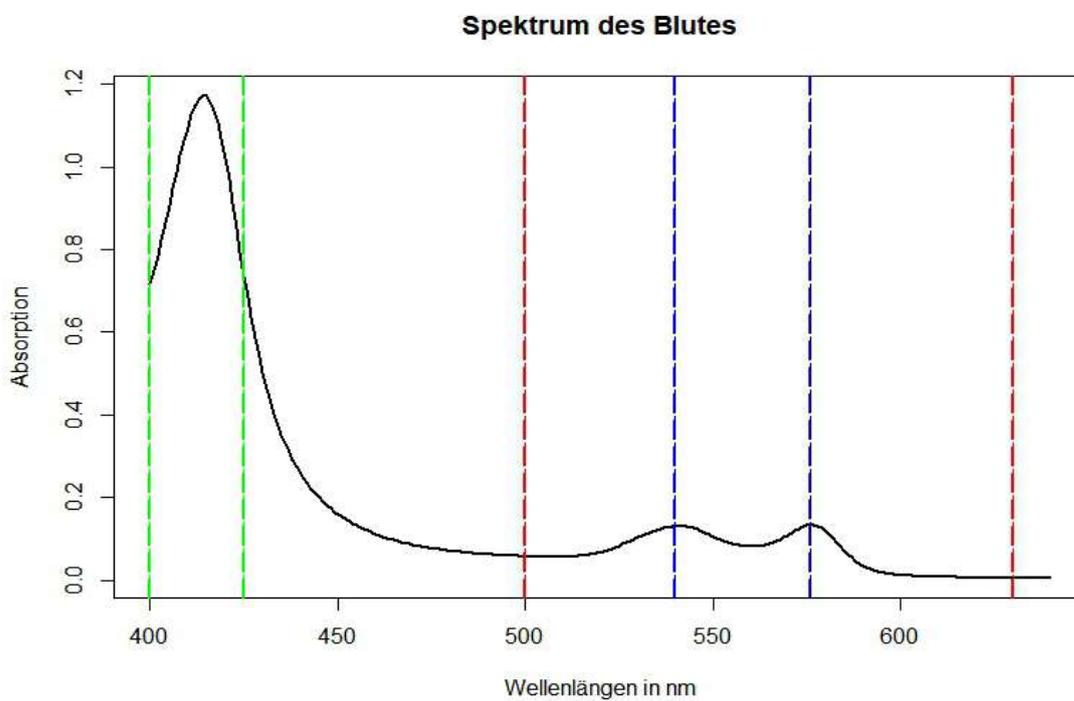


Abbildung 2.6: **Das Absorptionsspektrum des Blutes von 400 bis 640 Nanometer**

Die Abbildung zeigt das Spektrum des Blutes von 400 bis 640 Nanometer. Zu sehen sind die beiden Oxyhämoglobin-Peaks bei 540 und 576 Nanometer (blau), die beiden Methämoglobin-Peaks bei 500 und 630 Nanometer (rot) und die Soret-Bande, die sich von circa 400 bis 425 Nanometer (grün) erstrecken.

3 Material und Methoden

Um das hämolytische Verhalten alternder Blutproben zu untersuchen, wurde Schweineblut, bei einem örtlichen Fleischer bestellt, verwendet. Zusätzlich zu dem Blut wurden Bechergläser zum Lösen der Blutflecken, Einmalpipetten und drei verschiedene Lösungsmittel eingesetzt. Darunter zählen destilliertes Wasser, eine isotone Kochsalzlösung und 30 prozentige Zitronensäure, die zusammen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 Prozent gesenkt wurde. Das Ziel war es, spektrophotometrische Aufnahmen einzelner Blutproben herzustellen. Die Untersuchungen fanden in einem Labor der Hochschule Mittweida statt.

3.1 Blutproben

Um Messungen der einzelnen Blutproben durchführen zu können, wurden 55 Bluttropfen mit einem Volumen von jeweils fünfzig Mikroliter auf Filterpapierstücke mit einer Größe von etwa zwei mal zwei Zentimetern aufgetragen (Abbildung 3.1).

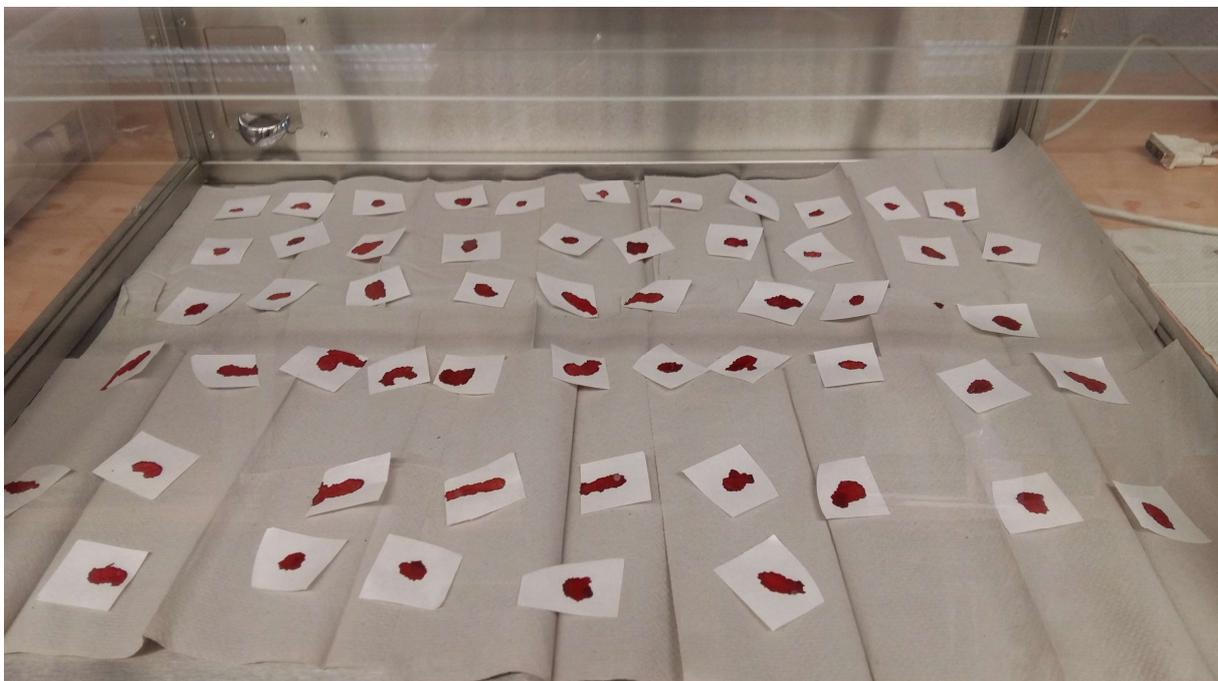


Abbildung 3.1: **Auf Filterpapier aufgetragene 55 Blutflecken**

Die Abbildung zeigt die 55, mit Schweineblut erschaffenen Blutflecken, lagernd in einem unbenutzten UV-Schrank.

Bei vierzehn der aufgetragenen Blutflecken handelt es sich um geschütteltes Blut. Dabei wurde ein Teil des Schweineblutes in eine kleine Polyethylenterephthalat (PET) Wasserflasche gefüllt und zweimal leicht auf und ab geschüttelt. Dieses Blut wurde anschließend auf die unteren vierzehn Filterpapierstücke, die in Abbildung 3.1 zu sehen sind, aufgetragen. Die restlichen Blutflecken wurden ohne Schütteln erzeugt. Die Flecken des geschüttelten Blutes wurden nur mit destilliertem Wasser gelöst, wobei dagegen die ungeschüttelten Blutflecken sowohl mit destilliertem Wasser als auch mit Kochsalzlösung und Zitronensäure gelöst wurden. Die getrockneten Blutflecken wurden dann, nachdem sie zehn Minuten gelöst wurden, mit einer Pipette in Küvetten gefüllt.

Am Tag der Abholung war das Blut bereits 24 Stunden alt. Aus diesem Grund und, da sich die Blutalterung am ersten Tag besonders auffällig zeigt, sollten gleich vier Messungen erfolgen. Nachdem das Blut um 08:40 Uhr aufgetragen wurde, trocknete es eine Stunde. Die Trocknung und Lagerung erfolgte bei Tagesbedingungen in einem unbenutzten UV-Schrank. Danach erfolgte die erste Messung. Die zeitliche Aufteilung der Messungen sowie die verwendeten Lösungsmittel und deren Konzentration können der Tabelle 3.1 entnommen werden. Bei der ersten Messung des Tages wurden sowohl fünf als auch 50 Milliliter der Lösungen verwendet, um herauszufinden, welche Konzentration sich am Besten für noch folgende Messungen eignen würde. Das Absorptionsspektrum der Messungen mit der 50 Milliliter-Lösung zeigten das komplette Spektrum des Blutes an wie es in Abbildung 2.6 zu sehen ist. Jedoch sollten für diese Experimente die Peaks des Oxyhämoglobins besonders in den Vordergrund gestellt werden. Daher fiel die Entscheidung auf die Lösung mit fünf Milliliter. Außerdem wurde destilliertes Wasser jeweils zweimal benutzt, um sowohl den Fleck des geschüttelten als auch den des ungeschüttelten Blutes zu lösen.

Tabelle 3.1: **Durchgeführte Messungen am ersten Tag der Blutalterung**

Die Tabelle zeigt die zeitliche Aufteilung der Messungen am ersten Tag der Blutalterung und die dazu verwendeten Lösungsmittel

Zeit der Messungen	verwendete Lösungsmittel und deren Konzentration
09:40 Uhr	5 ml destilliertes Wasser für das geschüttelte Blut 50 ml destilliertes Wasser für das geschüttelte Blut 5 ml destilliertes Wasser 50 ml destilliertes Wasser 5 ml Kochsalzlösung 50 ml Kochsalzlösung 5 ml Zitronensäure 50 ml Zitronensäure
10:40 Uhr	5 ml destilliertes Wasser für das geschüttelte Blut 5 ml destilliertes Wasser 5 ml Kochsalzlösung 5 ml Zitronensäure
11:40 Uhr	5 ml destilliertes Wasser für das geschüttelte Blut 5 ml destilliertes Wasser 5 ml Kochsalzlösung 5 ml Zitronensäure
14:40 Uhr	5 ml destilliertes Wasser für das geschüttelte Blut 5 ml destilliertes Wasser 5 ml Kochsalzlösung 5 ml Zitronensäure

3.2 Spektralphotometrische Messungen

Die spektroskopischen Messungen wurden mit einem Spektralphotometer für ultraviolettes und sichtbares Licht, Modellname: UV-1800 der Firma Shimadzu Corporation, durchgeführt (Abbildung 3.2).

Der Wellenlängenbereich des Spektralphotometers liegt zwischen 190 und 1100 Nanometer. Im Probenraum des Gerätes können zwei rechteckige Zehn-Millimeter-Küvetten in einen dafür vorgesehenen Proben- und Referenzzellenhalter eingesetzt werden. Das Spektralphotometer besitzt sowohl eine Deuterium-Lampe (D2) als auch eine Halogen-Lampe (WI). Die D2-Lampe wird für den Wellenlängenbereich ab 190 Nanometer (ultravioletter Bereich) bis zum nachstehend genannten Lampenwechsel und die Halogen-Lampe bis 1100 Nanometer (sichtbarer und nahinfraroter Bereich) eingesetzt. Der Lampenwechsel erfolgt automatisch bei 340,8 Nanometer; ist aber zwischen 295 und 364 Nanometer benutzerspezifisch einstellbar.

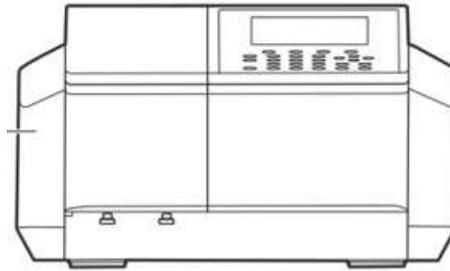


Abbildung 3.2: **UV-1800 Spektralphotometer der Firma Shimadzu Corporation**

Das Bild zeigt das für die Experimente verwendete Spektralphotometer der Firma Shimadzu Corporation [49]

Nach dem Einschalten des Gerätes wird dieses zunächst initialisiert. Sobald dieser Vorgang abgeschlossen ist, kann das Spektralphotometer genutzt werden. Für die Experimente meiner Arbeit wurde dabei das Gerät eine halbe Stunde vor Nutzung zum Warmlaufen eingeschaltet.

Die Aufnahme des Blutspektrums erfolgte im Wellenlängenbereich von 400 bis 640 Nanometer. In diesem Bereich ist zwar die Soret-Bande nicht vollständig zu sehen, aber die Peaks für das Oxyhämoglobin (bei 540 und 576 Nanometer) und das für Methämoglobin (bei 500 und 630 Nanometer) sind gut sichtbar.

Das Spektralphotometer kann mit der Software *UVProbe* gesteuert werden. Dazu muss die Taste *PC Ctrl* am Gerät betätigt und die Software verbunden werden. Über das Programm können unter anderem sowohl der Wellenlängenbereich als auch das Ziel der Messungen, beispielsweise die Absorption, bequem eingestellt werden. Alle Messungen wurden mit Hilfe dieser Computer-Software durchgeführt.

Um für alle Messungen das gleiche Blutalter zu erhalten, mussten die benötigten Blutflecken zeitgleich in den Lösungen gelöst werden. Danach konnten die Messungen nach und nach durchgeführt werden.

Nach den vier Messungen am ersten Tag, sollten in folgenden Tagen jeweils eine Messung für jedes Lösungsmittel erfolgen. Die Zeiträume sind in der Tabelle 3.2 ersichtlich. Nach fünfzehn Tagen waren die Messungen abgeschlossen.

Tabelle 3.2: **Durchgeführte Messungen mit fortschreitendem Blutalter**

Die Tabelle stellt den zeitlichen Ablauf der durchgeführten Messungen über 15 Tage mit Datum und Uhrzeit dar.

Blutalter	Datum	Uhrzeit	Messungen
Tag 1	26.07.2017	09:40	1 - 1 Stunde
		10:40	1 - 2 Stunden
		11:40	1 - 3 Stunden
		14:40	1 - 6 Stunden
Tag 2	27.07.2017	09:05	1 - 2 Tage
Tag 3	28.07.2017	09:05	1 - 3 Tage
Tag 6	31.07.2017	09:10	1 - 6 Tage
Tag 7	01.08.2017	09:00	1 - 7 Tage
Tag 9	03.08.2017	09:00	1 - 9 Tage
Tag 15	09.08.2017	08:45	1 - 15 Tage

Die Auswertung der gemessenen Absorptionsspektren konnte nicht in dem mitgelieferten Programm *UVProbe* durchgeführt werden. Dazu wurde das Statistik- und Grafikprogramm *R* benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Spektralphotometrische Experimentreihen

Der Einfluss und die Auswirkung ausgewählter Lösungsmittel (destilliertes Wasser, Kochsalzlösung und Zitronensäure) wurden mit einem Spektralphotometer an zehn ausgewählten Zeitpunkten untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten eindeutige Veränderungen des Blutspektrums mit zunehmendem Blualter.

Die in den Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.3 dargestellten Blutspektren sind ein Ausschnitt der jeweils zehn durchgeführten Messungen pro Lösungsmittel. Zu sehen sind Spektren des Blutes mit einem Alter von einer Stunde, sechs Stunden, sechs Tagen und 15 Tagen. Es ist zu erkennen, dass die Oxyhämoglobin-Peaks (in den Abbildungen rot dargestellt) mit zunehmendem Alter bei 540 und 576 Nanometer stark abnehmen. Die Methämoglobin-Peaks, die etwa ab dem zweiten Tag auftreten und bei 500 und 630 Nanometer zu finden sind (in den Abbildungen blau dargestellt), nehmen dagegen mit ansteigendem Alter zu. Es wurde weiterhin festgestellt, dass die spektralphotometrischen Messungen, die mit der Zitronensäurelösung (Abbildung 4.4) durchgeführt wurden, weder die Peaks des Oxyhämoglobins noch die des Methämoglobins darstellen konnten.

Durch die gewählte Konzentration der Lösungsmittel mit fünf Milliliter ist die Soret-Bande des Blutspektrums (zwischen 400 und 425 Nanometer) nicht komplett zu erkennen und kann daher folgend nicht betrachtet werden.

Mit steigendem Alter bis zu fünfzehn Tagen nehmen die Oxyhämoglobin-Peaks weiter ab und die des Methämoglobins entsprechend zu, bis die eigentlich typischen Spitzen des Blutspektrums nicht mehr ersichtlich sind.

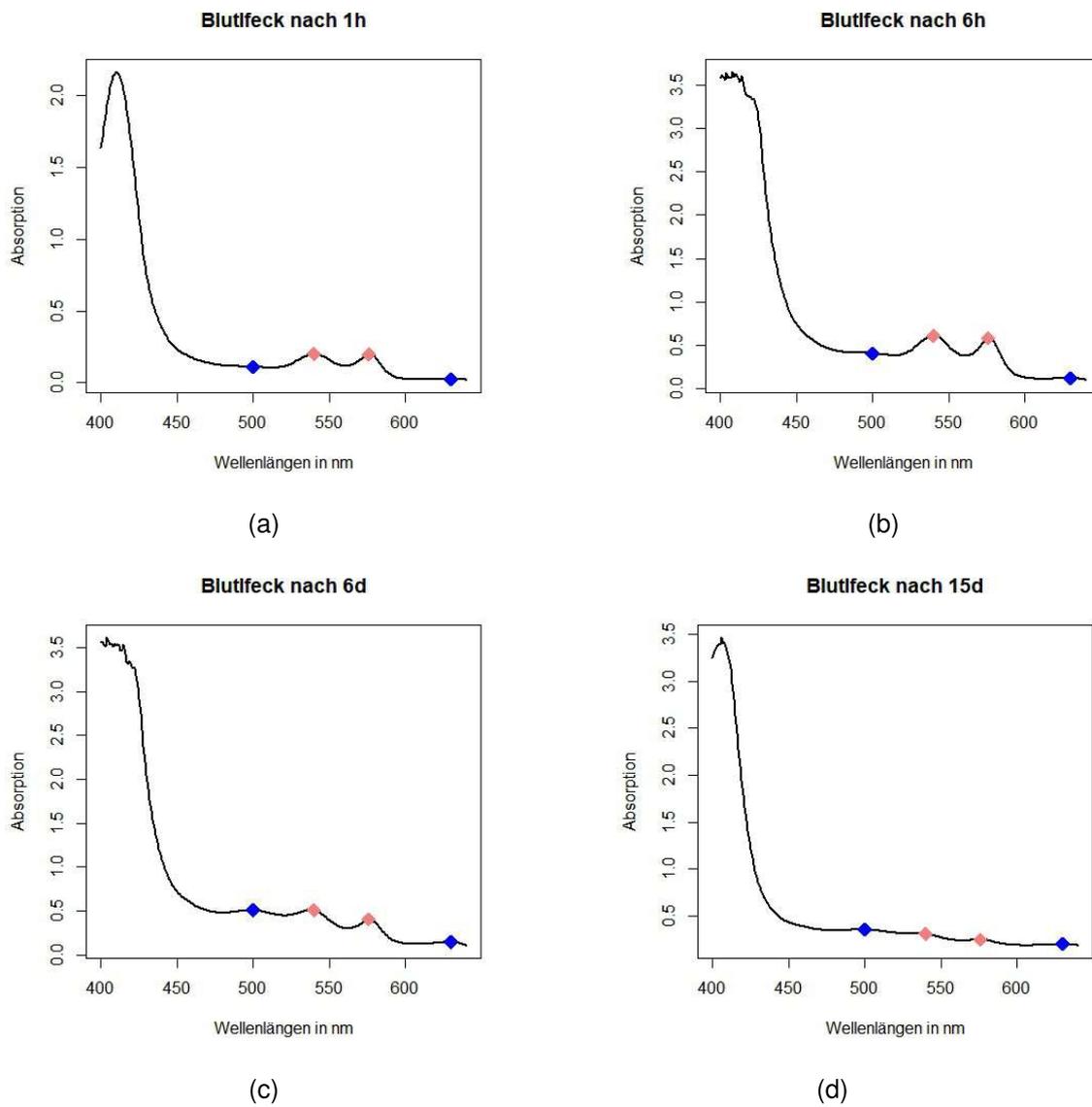


Abbildung 4.1: **Experimentreihe mit destilliertem Wasser**

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der spektralphotometrischen Messungen; durchgeführt mit destilliertem Wasser.

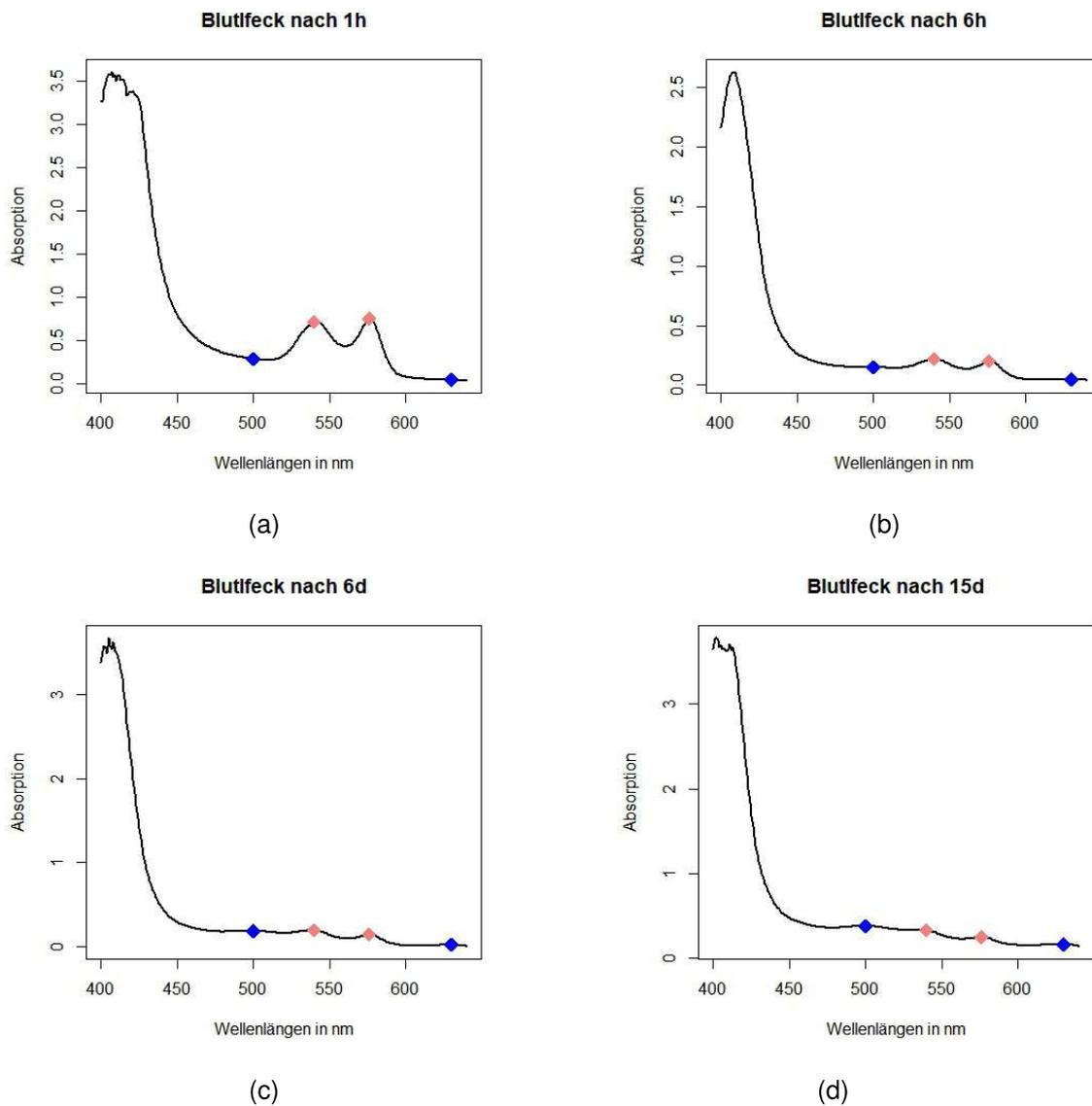


Abbildung 4.2: **Experimentreihe des geschüttelten Blutes mit destilliertem Wasser**
Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der spektralphotometrischen Messungen des geschüttelten Blutes; durchgeführt mit destilliertem Wasser.

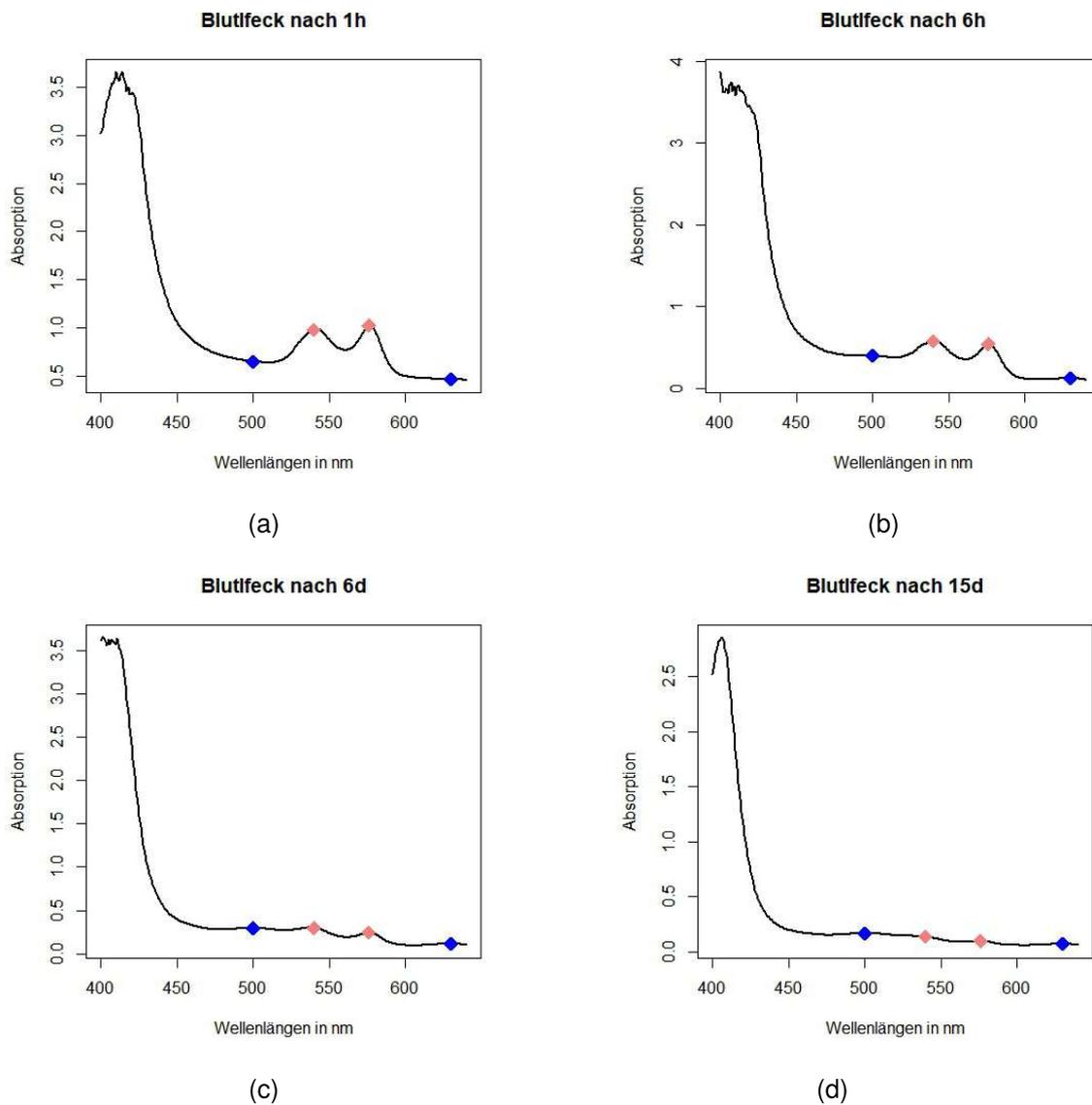


Abbildung 4.3: **Experimentreihe mit Kochsalzlösung (NaCl)**

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der spektralphotometrischen Messungen; durchgeführt mit Kochsalzlösung.

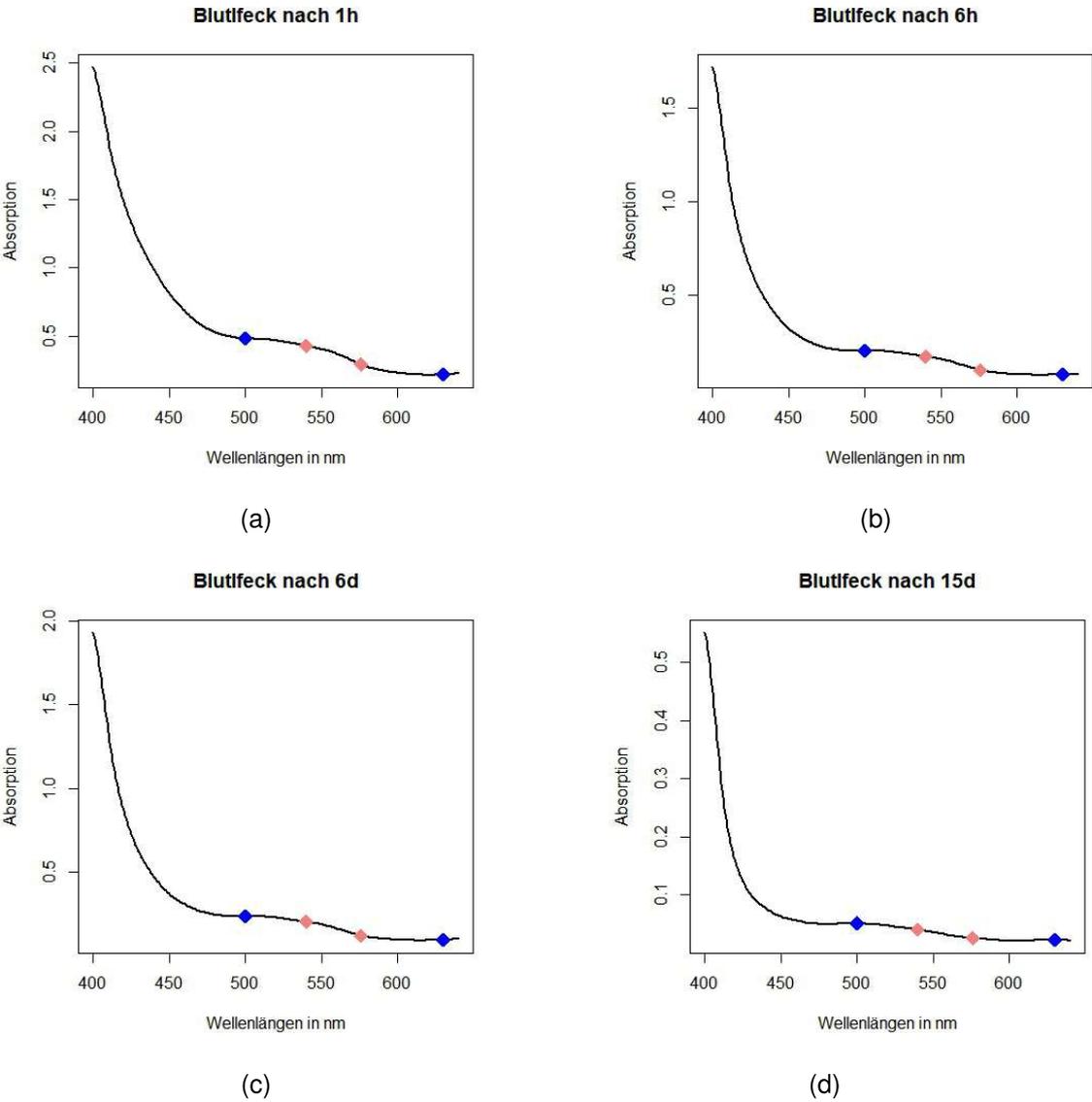


Abbildung 4.4: **Experimentreihe mit Zitronensäure**
Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der spektralphotometrischen Messungen; durchgeführt mit Zitronensäure.

4.2 Umwandlung der Hämoglobinderivate

Um die Veränderungen über einen Zeitraum von fünfzehn Tagen sichtbar zu machen, wurden die Werte der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks ins Verhältnis gesetzt. Um dies umsetzen zu können, wurden die Peaks aller zehn Messungzeitpunkte in eine Datenbank gespeichert und die Werte an den vier ausgewählten Punkten (500, 540, 576 und 630 Nanometer) berechnet. Die Ergebnisse können in Tabelle 4.1 eingesehen werden.

Tabelle 4.1: **Verhältnisse der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks**

In der Tabelle stehen die Ergebnisse der Verhältnisberechnungen der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks über einen Zeitraum von 15 Tagen (angegeben in Stunden). Reihe 1= Experimentreihe mit destilliertem Wasser; Reihe 2= Experimentreihe des geschüttelten Blutes mit destilliertem Wasser; Reihe 3= Experimentreihe mit Kochsalzlösung; Reihe 4= Experimentreihe mit Zitronensäure

Alter	1	2	3	6	48	72	144	168	216	360
Reihe 1	0.867	0.266	0.976	0.662	0.284	0.234	0.261	0.24	0.095	0.001
Reihe 2	1.137	0.426	0.337	0.22	0.226	0.303	0.129	0.155	0.077	0.031
Reihe 3	0.891	0.962	0.736	0.599	0.381	0.128	0.127	0.089	0.08	-0.007
Reihe 4	0.018	-0.013	-0.01	-0.008	-0.1	-0.1	-0.1	-0.007	-0.1	-0.008

Mit dem berechneten Verhältnis wird die Umsetzung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin deutlich gemacht. Destilliertes Wasser wird hierbei als Vergleichsgrundlage angesehen. Davon ausgehend soll der Unterschied der Umsetzung zu den anderen Lösungsmitteln betrachtet werden. In Abbildung 4.5 wird dieser Unterschied dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Experimentreihe mit destilliertem Wasser und die mit Kochsalzlösung am ersten Tag besonders stark verändert; ab dem zweiten Tag verläuft sie jedoch langsamer. Am letzten Tag, nach 360 Stunden Bluttrocknung, scheint die Umsetzung der verschiedenen Lösungen von Oxyhämoglobin in Methämoglobin beinahe identisch zu sein.

Um herauszufinden, welches Lösungsmittel die Umwandlung der Hämoglobinderivate beschleunigt oder verlangsamt, wurden diese in Abbildung 4.6 an drei ausgewählten Zeitpunkten verglichen. Im weiteren Verlauf wurden jeweils zwei Kurvenverläufe der Lösungsmittel, ausgehend vom destilliertem Wasser, gesondert betrachtet, um aufzuklären, wie groß die Unterschiede sind. Diese Ergebnisse können in Tabelle 4.2 eingesehen werden. Die grün hinterlegten Felder deuten auf eine schnellere Umwandlung des Oxyhämoglobins hin; die roten Felder verdeutlichen eine langsamere Umwandlung. Da die Zitronensäure keine Umwandlung der Hämoglobinderivate zulässt, wird diese hier nicht weiter betrachtet.

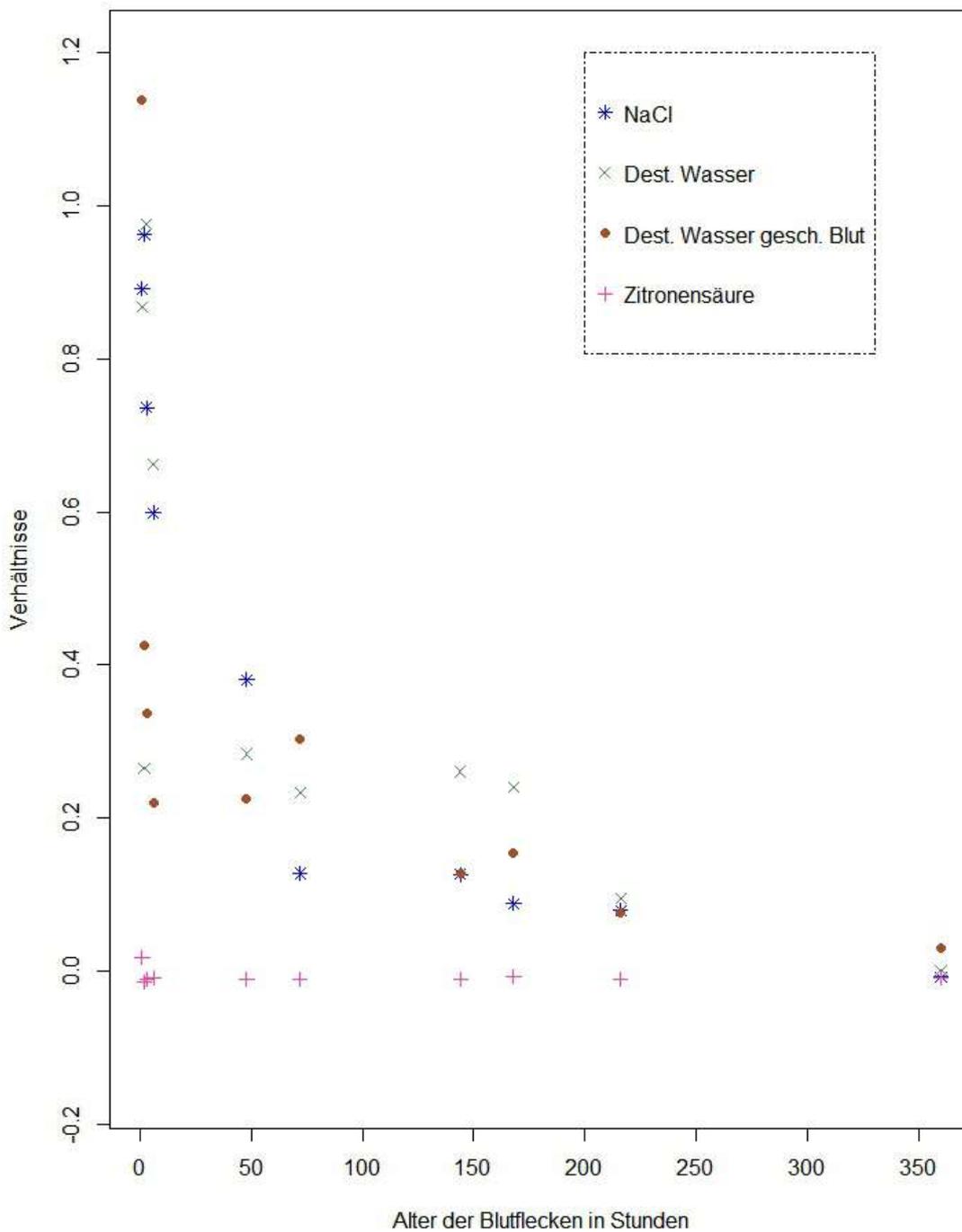


Abbildung 4.5: **Darstellung der Verhältnisse der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks**

Die Abbildung verdeutlicht die Wirkung der Lösungsmittel auf den Alterungsprozess der Blutproben durch die berechneten Verhältnisse der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks über den Zeitraum von 15 Tagen. Experimentreihe mit Kochsalzlösung= blau, Experimentreihe mit destilliertem Wasser= grün, Experimentreihe des geschüttelten Blutes mit destilliertem Wasser= braun, Experimentreihe mit Zitronensäure= pink

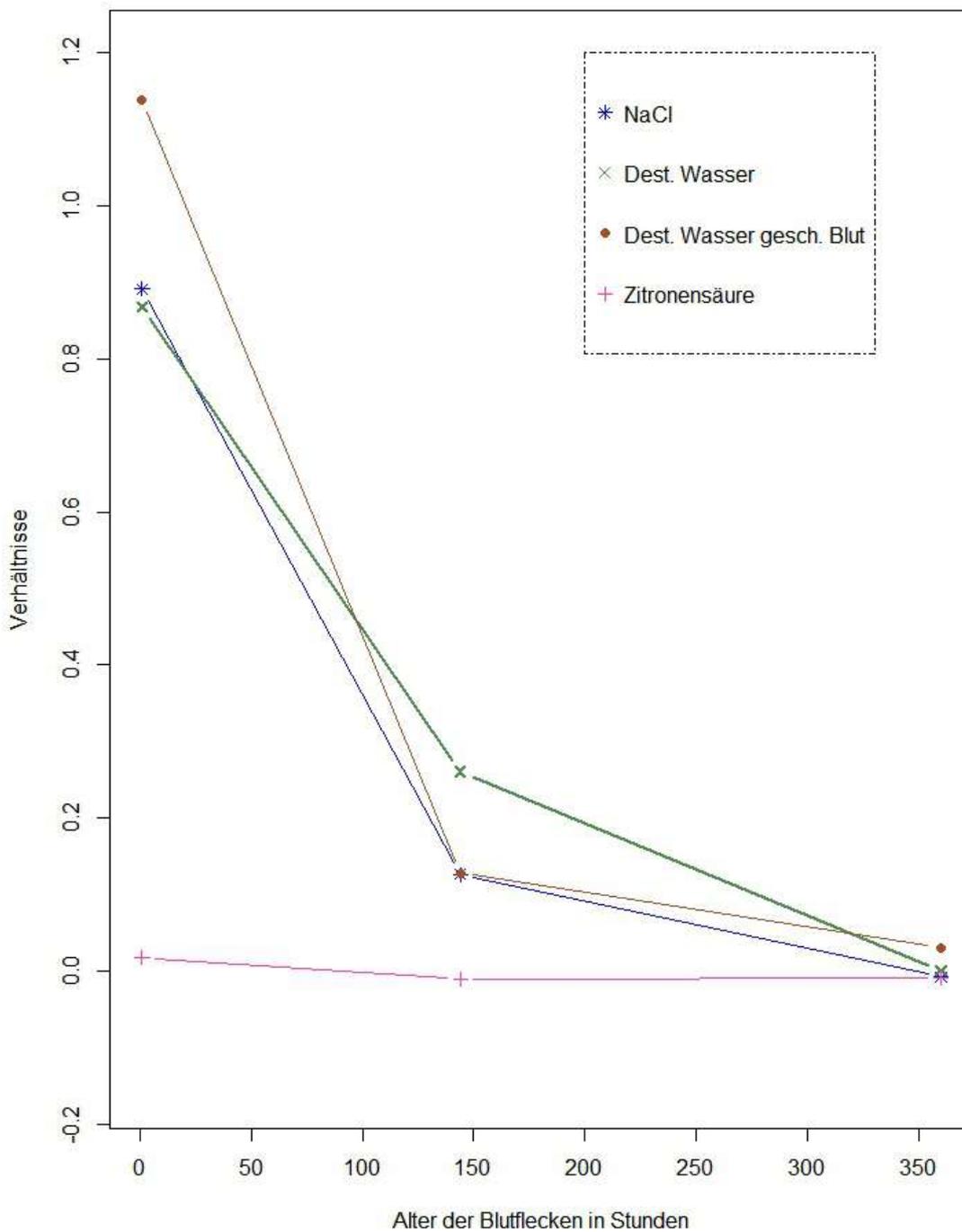


Abbildung 4.6: **Verhältnis der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks an drei ausgewählten Messzeitpunkten**

Die Abbildung zeigt das Verhältnis der Umsetzung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin zu drei ausgewählten Zeitpunkten. Experimentreihe mit Kochsalzlösung= blau, Experimentreihe mit destilliertem Wasser= grün, Experimentreihe des geschüttelten Blutes mit destilliertem Wasser= braun, Experimentreihe mit Zitronensäure= pink

Tabelle 4.2: **Abweichung der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin an drei ausgewählten Zeitpunkten**

In der Tabelle ist die Abweichung der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin in Prozent zu sehen. Vergleichslösung hierbei ist destilliertes Wasser.

Alter in Stunden	Vergleich mit dem geschüttelten Blut in destilliertem Wasser	Vergleich mit Kochsalzlösung
1	31,14%	2,77%
144	50,57%	51,34%
360	3000,00%	800,00%

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte das hämolytische Verhalten alternder Blutproben mit drei ausgewählten Lösungsmitteln (destilliertes Wasser, Kochsalzlösung und Zitronensäure) untersucht werden. Dazu wurden spektralphotometrische Aufnahmen der Absorptionsspektren von 40 präparierten Blutproben aufgezeichnet und ausgewertet. Es sollte herausgefunden werden, in welchem Umfang sich die verschiedenen Lösungsmittel auf die Blutalterung auswirken.

Die Hämolyse ist die frühzeitige Zerstörung eines Erythrozyts innerhalb oder auch außerhalb des Organismus. Sie kann unter anderem durch osmotische Druckdifferenzen ausgelöst werden. Durch Hinzugeben von hypotonen oder hypertonen Flüssigkeiten zum Blut kann der Blutzellendruck aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Laut E. LEHNARTZ kann Hämolyse zum Beispiel durch Harnstoff, destilliertes Wasser, schwache Säuren oder auch durch Alkohol ausgelöst werden. Eine isotone Kochsalzlösung dagegen erwirkt keine osmotische Druckänderung. Die Konzentration dieser Lösung müsste stark verdünnt werden, damit eine Hämolyse ausgelöst werden kann. [31]

Da der pH-Wert des Blutes bei 7,4 liegt, würde also eine schwache Säure mit niedrigerem pH-Wert die Hämolyse auslösen. Aus diesem Grund habe ich mich für meine Experimente für Zitronensäure entschieden, die einen pH-Wert von 1,2 bis 1,5 hat [38]. Außerdem wählte ich destilliertes Wasser und eine isotone Kochsalzlösung als weitere probate Lösungsmittel für die Blutaltersbestimmung [5, 7, 24, 28, 40, 46].

Hämolyse kann ebenfalls durch mechanische Einflüsse ausgelöst werden. Neben dem Verreiben der Erythrozyten mit Mörser oder Quarzsand oder dem Einfrieren und wieder Auftauen, kann das Schütteln des Blutes diese auslösen. [18, 34, 44, 52]

Um dies zu testen, wurde das Blut für eine Experimentreihe in einer Polyethylenterephthalat Wasserflasche zwei mal leicht auf und ab geschüttelt. Nach dem es anschließend auf das Filterpapier aufgetragen wurde, sollte es für die kommenden spektralphotometrischen Messungen nur mit destilliertem Wasser gelöst werden.

Insgesamt wurden 55 Blutropfen auf Filterpapier aufgetragen, von denen 40 für die Experimente genutzt worden; die restlichen dienten als Reserve. Die 40 getrockneten Blutropfen

wurden mit Kochsalzlösung und den Lösungsmitteln, die eine Hämolyse auslösen sollen, gelöst. Es wurden pro Lösungsmittel jeweils zehn spektralphotometrische Messungen durchgeführt, mit denen die Absorption des gelösten Blutes bestimmt werden sollte.

Die Messungen bezogen sich auf den Bereich des sichtbaren Lichts (400 bis 640 Nanometer). In diesem Bereich ist zwar die Soret-Bande nicht vollständig zu sehen, aber die für das Blutspektrum typischen Peaks für das Oxyhämoglobin (bei 540 und 576 Nanometer) und das Methämoglobin (bei 500 und 630 Nanometer) sind gut ersichtlich.

Laut E. K. HANSON und S. S. KIND nehmen aufgrund der Oxidation des Blutes die Peaks des Oxyhämoglobin mit zunehmendem Blutalter ab und die des Methämoglobins steigen an [17, 24]. Mit den Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.3 kann dies bestätigt werden. Es ist zu erkennen, dass die Peaks bei 540 und 576 Nanometer (Oxyhämoglobin) über die Zeit flacher werden. Die Methämoglobin-Peaks bei 500 und 630 Nanometer dagegen bilden sich nach dem zweiten Tag aus und steigen an. Das Blut, das mit Zitronensäure gelöst wurde, wies keinerlei Peaks auf. Es ist anzunehmen, dass Zitronensäure eine sofortige Umwandlung von Oxyhämoglobin in Hämichrom unterstützt oder es nicht in der Lage ist, die Hämolyse, wie von E. LEHNARTZ beschrieben [31], auszulösen. Die Abbildung 4.4 zeigt, dass keine Sauerstoff-Peaks über den Zeitraum von 15 Tagen vorhanden sind.

Um die Veränderungen der Blutspektren über den Zeitraum von fünfzehn Tagen sichtbar zu machen, wurden die Werte der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks ins Verhältnis gesetzt. Mit dem berechneten Verhältnis wird die Umsetzung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin deutlich gemacht. Dabei wurde destilliertes Wasser als Vergleichslösung angesehen. Davon ausgehend sollte der Unterschied der Umsetzung zu den anderen Lösungsmitteln betrachtet werden. In der Abbildung 4.5 ist dieser Unterschied zu erkennen. Sowohl das Blutspektrum des destillierten Wassers als auch das der Kochsalzlösung ändert sich am ersten Tag der Blutalterung besonders. Ab dem zweiten Tag verläuft diese Veränderung langsamer; stagniert jedoch nicht. Am letzten Tag ist zu erkennen, dass die Umsetzung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin bei beiden Lösungen beinahe identisch ist. Grund dafür ist, dass Oxyhämoglobin außerhalb des Organismus (ex vivo) komplett zu Methämoglobin und später zu Hämichrom oxidiert. Ausnahme davon bildet das mit Zitronensäure gelöste Blut. Die Veränderung steht annähernd still, da die Zitronensäure entweder die Blutzellstruktur komplett zerstört hat oder die Umwandlung des Oxyhämoglobin beschleunigt hat. Anhand der bisherigen Erkenntnisse kann durch den Rückgang des Oxyhämoglobins und dem Auftreten des Methämoglobins ab dem zweiten Tag schon eine grobe Blutaltersschätzung durch Ablesen

der Absorption erfolgen. Da unter anderem auch schon B. L. HORECKER, E. K. HANSON und S. S. KIND herausgefunden haben, dass die Umwandlung der Hämoglobinderivate mit dem Blutalter zusammenhängt, war dieses Ergebnis zu erwarten [17, 19, 24].

Um nun herauszufinden, welches Lösungsmittel die Umwandlung der Hämoglobinderivate beschleunigt oder verlangsamt und somit den Alterungsprozess des Blutes beeinflusst, wurden die Verhältnisse an drei ausgewählten Zeitpunkten miteinander verglichen. Eine schnellere oder langsamere Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin würde bedeuten, dass die Blutaltersbestimmung nicht exakt erfolgen kann. Das Ablesen der Absorption des Blutes könnte hierbei zu Fehlern führen und somit die Bestimmung des Blutalters beeinflussen. Die in Tabelle 4.2 angegebenen Prozentzahlen sind das Ergebnis des Vergleiches zweier Lösungsmittel, ausgehend von destilliertem Wasser. Es konnte festgestellt werden, dass das geschüttelte Blut am ersten und letzten Tag langsamer umgewandelt wird; am sechsten Tag geschieht dies jedoch schneller. Die Kochsalzlösung dagegen setzt anfangs das Oxyhämoglobin langsamer um, am sechsten und letzten Tag jedoch schneller. Die Zitronensäure lässt eine Umwandlung der Hämoglobinderivate nicht zu; diese wird hier nicht weiter betrachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kochsalzlösung das Oxyhämoglobin schneller in Methämoglobin umwandelt. Da Kochsalzlösung keine Hämolyse auslöst, wird angenommen, dass es sich hierbei um den normalen Alterungsprozess des Blutes handelt. Sowohl die Hämoglobinderivate des geschüttelten Blutes in destilliertem Wasser als auch die des ungeschüttelten Blutes in destilliertem Wasser werden im Vergleich zu denen der Kochsalzlösung langsamer umgewandelt. Durch den unterschiedlich schnellen Umwandlungsprozess kann die Blutaltersschätzung ungenau werden. Das Blut, das mit destilliertem Wasser versetzt wurde oder dem Schütteln ausgesetzt war, kann bei der Altersschätzung jünger erscheinen. Es gibt also einen Unterschied zwischen der Altersbestimmung von hämolysiertem und nicht hämolysiertem Blut. V. V. TUCHIN erkannte 2004 in seiner Arbeit, dass hämolysiertes Blut eine höhere Absorption aufweist als nicht hämolysiertes Blut [56]. Die größten Unterschiede der Absorption weisen dabei die für das Blutspektrum typischen Spitzen (Soret-Bande, Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Peaks) auf. Aufgrund der Erkenntnis von V. V. TUCHIN kann man folgendes sagen: je höher die gemessene Absorption des Blutes, desto höher das berechnete Verhältnis, das die Umsetzung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin verdeutlicht. Das wiederum bedeutet, dass die Umsetzung, wie oben bereits erwähnt bei hämolysiertem Blut, langsamer verläuft, als bei nicht hämolysiertem Blut. Durch eine langsamere Umsetzung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin erscheint das Alter des Blutes damit jünger, als es in Wirklichkeit ist.

In dieser Arbeit wurde Schweineblut verwendet, welches beim Kauf bereits einen Tag alt war. Es kann sein, dass es durch den Transport bereits geschüttelt oder gepresst wurde, sodass eine Hämolyse schon vor Beginn der Experimente ausgelöst wurde. Damit kann die Kochsalzlösung, die keine Hämolyse auslösen sollte, nicht die gewünschten Ergebnisse liefern.

Um die Ergebnisse zu festigen, sollten bei künftigen Experimenten einige Fehler von vornherein bedacht und ausgeschlossen werden. Es sollte sichergestellt werden, dass das erworbene Blut keinerlei mechanischen oder chemischen Einflüssen unterlag, wodurch es hämolysiert sein könnte. Es sollte weiterhin darauf geachtet werden, dass das Blut frisch ist. Das bei diesen Experimenten verwendete Schweineblut war laut Verkäuferin bereits ungefähr einen Tag alt. Bei frischem Blut kann jede Minute der Blutalterung genauestens nachvollzogen werden, was jedoch bei dem erworbenen Blut von vornherein nicht möglich war. Desweiteren kann es vorkommen, dass es zu Fehlern beim Lösen der Blutproben in den Lösungsmitteln kommt. Durch längere oder kürzere Lösung des Blutes können Unterschiede in den Blutspektren und damit verzerrte Ergebnisse auftreten. Bei der Lagerung der Blutproben sollte darauf geachtet werden, dass diese über den Zeitraum der spektroskopischen Messungen den gleichen Bedingungen unterliegen (Temperatur, Licht und anderes).

Momentan konnten keinerlei vergleichende Arbeiten gefunden werden, die das hämolytische Verhalten alternder Blutproben mit ausgewählten Lösungsmitteln untersuchten. Um die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zu bestätigen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Außerdem wäre es möglich, noch einmal die gleiche Herangehensweise zu nutzen, um die hier erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Ebenso kann der Bereich der spektroskopischen Messungen ausgedehnt werden, was zusätzlich die Interpretation der Soret-Bande unter hämolytischen Bedingungen ermöglicht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Hämolyse Einfluss auf die Altersbestimmung eines Blutfleckens hat. Ist Blut durch eine Lösung oder mechanische Einflüsse hämolysiert, kann eine Blutaltersbestimmung zu Fehlern führen.

Literaturverzeichnis

- [1] ANDRASKO J. (Hrsg.): *The estimation of the age of bloodstains by HPLC analysis*, Journal of Forensic Sciences 42, 1997
- [2] ANTWERPES F. (Hrsg.), GRAF VON WESTPHALEN G. (Hrsg.), MATHIES L. (Hrsg.): *Oxygenierung*, <http://flexikon.doccheck.com/de/Oxygenierung>, Stand: 02.08.2017
- [3] ANTWERPES F. (Hrsg.), LÜTFRENK T. (Hrsg.): *Methämoglobin*, <http://flexikon.doccheck.com/de/Meth%C3%A4moglobin>, Stand: 16.08.2017
- [4] BAYERISCHER RUNDFUNK (Hrsg.): *Zellen des Immunsystems*, <http://www.br.de/telekolleg/faecher/biologie/biologie-07-immunsystem102.html>, Stand: 02.08.2017
- [5] BERGMANN T. (Hrsg.), HEINKE F. (Hrsg.), LABUDDE D. (Hrsg.): *Towards substrate-independent age estimation of blood stains based on dimensionality reduction and k-nearest neighbor classification of absorbance spectroscopy data*, Forensic Science International 278, 2017
- [6] BETHE A. (Hrsg.), v. BERGMANN G. (Hrsg.), EMBDEN G. (Hrsg.), ELLINGER A. (Hrsg.): *Blut und Lymphe: Erster Teil Blut*, Springer-Verlag, 2013, S. 567-580
- [7] BREMMER R. H. (Hrsg.), DE BRUIN K. G. (Hrsg.), VAN GEMERT M. J. C. (Hrsg.), VAN LEEUWEN T. G. (Hrsg.), AALDERS M. C. G. (Hrsg.): *Forensic quest for age determination of bloodstains*, Forensic Science International 216, 2012, S. 1-11
- [8] BREMMER R. H. (Hrsg.), NADORT A. (Hrsg.), VAN LEEUWEN T. G. (Hrsg.), VAN GEMERT M. J. C. (Hrsg.): *Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy*, Forensic Science International 206, 2011, S. 166-171
- [9] BROOKE H. (Hrsg.), BARANOWSKI M. R. (Hrsg.), MCCUTCHEON J. N. (Hrsg.), MOR-

- GAN S. L. (Hrsg.), MYRICK M. L. (Hrsg.): *Multimode imaging in the thermal infrared for chemical contrast enhancement*, Analytical Chemistry 82, 2010, S. 8412-8420
- [10] BUNDESKRIMINALAMT (Hrsg.): *Kleine Historie der Daktyloskopie*, https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/Erkennungsdienst/Historie/historie_node.html, Stand: 19.08.2017
- [11] CATTS E. P. (Hrsg.), GOFF M. L. (Hrsg.): *Forensic entomology in criminal investigations*, Annual review of entomology, 1992, S. 253-272
- [12] DECASTRO T. (Hrsg.), NICKSON T. (Hrsg.), CARR D. (Hrsg.), KNOCK C. (Hrsg.): *Interpretation the formation of bloodstains on selected apparel fabrics*, International Journal of Legal Medicine, 2012
- [13] DONALDSON A. E. (Hrsg.), WALKER N. K. (Hrsg.), LAMONT, I. J. (Hrsg.), CORDINER S. J. (Hrsg.), TAYLOR M. C. (Hrsg.): *Characterising the dynamics of expired bloodstain pattern formation using high-speed digital video imaging*, International Journal of Legal Medicine, 2010
- [14] EDELMANN G. (Hrsg.), MANTI V. (Hrsg.), VAN RUTH S. M. (Hrsg.), VAN LEEUWEN T. (Hrsg.), AALDERS M. (Hrsg.): *Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy*, Forensic Science International 220, 2012, S. 239-244
- [15] EDELMANN G. (Hrsg.), VAN LEEUWEN T. G. (Hrsg.), AALDERS M. C. G. (Hrsg.): *Hyperspectral imaging for the age estimation of blood stains at the crime scene*, Forensic Science International 223, 2012, S. 72-77
- [16] GRASSBERGER M. (Hrsg.), SCHMID H. (Hrsg.): *Todesermittlungen - Befundnahme und Spurensicherung*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2014, S. 260ff.
- [17] HANSON E. K. (Hrsg.), BALLANTYNE J. (Hrsg.): *A Blue Spectral Shift of the Hemoglobin Soret Band Correlates with the Age (Time Since Deposition) of Dried Bloodstains*, PLOS ONE 5(9), 2010, S. 1-11

- [18] HÁRI P. (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1928, S. 138-141
- [19] HORECKER B. L. (Hrsg.): *The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near infra-red regions*, Journal of Biological Chemistry, 1943, S. 173-183
- [20] INOUE H. (Hrsg.), TABAKE F. (Hrsg.), IWASA M. (Hrsg.), MAENO Y. (Hrsg.): *Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by high-performance liquid chromatography*, International Journal of Legal Medicine 104, 1991, S. 127-131
- [21] KALISZAN M. (Hrsg.): *Studies on time of death estimation in the early post mortem period – Application of a method based on eyeball temperature measurement to human bodies*, Legal Medicine (Tokyo), 2013, S. 278-282
- [22] KALISZAN M. (Hrsg.), HAUSER R. (Hrsg.), KERNBACH-WIGHTON G. (Hrsg.): *Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling*, Legal Medicine (Tokyo), 2009, S. 111-117
- [23] KETTNER M. (Hrsg.), SCHMIDT A. (Hrsg.), WINDGASSEN M. (Hrsg.), SCHMIDT P. (Hrsg.), WAGNER C. (Hrsg.), RAMSTHALER F. (Hrsg.): *Impact height and wall distance in bloodstain pattern analysis - what pattern of round bloodstains can tell us*, International Journal of Legal Medicine, 2014
- [24] KIND S. S. (Hrsg.), PATTERSON D. (Hrsg.), OWEN G. W. (Hrsg.): *Estimation of the age of dried bloodstains by a spectrophotometric method*, Forensic Science, 1972, S. 27-54
- [25] KIND S. S. (Hrsg.), WATSON M. (Hrsg.): *The estimation of blood stain age from the spectrophotometric properties of ammoniacal blood stain extracts*, Forensic Science 2, 1973, S. 325-332
- [26] KLEIHAUER E. (Hrsg.), SCHMIDT G. (Hrsg.), STEIN G. (Hrsg.): *Beitrag zur Altersbestimmung von Blutflecken*, Archiv für Kriminologie 140, 1967, S. 84-94

- [27] KUNZ S. N. (Hrsg.), KLAWONN T. (Hrsg.), GROVE C. (Hrsg.): *Möglichkeiten und Grenzen der Blutspurenmusterverteilungsanalyse*, Wiener Medizinische Wochenschrift, 2014
- [28] KÖHLER U. (Hrsg.), OEPEN I. (Hrsg.): *Über die Eignung spektralanalytischer Methoden zur Bestimmung des Blutfleckenalters*, Zeitschrift für Rechtsmedizin 79, 1977, S. 183-187
- [29] LAMONTAGNE M. (Hrsg.), BOTONJIC-SEHIC E. (Hrsg.), BROWN C. W. (Hrsg.), TSAPARIKOS M. (Hrsg.): *Forensic application of near-infrared spectroscopy: aging of bloodstains*, Spectroscopy 24, 2009, S. 42-48
- [30] LEHMANN T. (Hrsg.): *UV/VIS Spektroskopie*, Freie Universität Berlin, http://www.bcp.fu-berlin.de/chemie/chemie/studium/ocpraktikum/_Unterlagen_Spektroskopie/uv.pdf, Stand: 16.08.2017
- [31] LEHNARZT E. (Hrsg.): *Einführung in die chemische Physiologie*, Springer-Verlag, 1952, S. 123-124
- [32] LI B. (Hrsg.), BEVERIDGE P. (Hrsg.), O'HARE W. T. (Hrsg.), ISLAM M. (Hrsg.): *The age estimation of blood stains up to 30 days old using visible wavelength hyperspectral image analysis and linear discriminant analysis*, Science and Justice 53, 2013, S. 270-277
- [33] LI B. (Hrsg.), BEVERIDGE P. (Hrsg.), O'HARE W. T. (Hrsg.), ISLAM M. (Hrsg.): *The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis*, Forensic Science International 212, 2011, S. 198-204
- [34] LIPPI G. (Hrsg.), SALVAGNO G. L. (Hrsg.), MONTAGNANA M. (Hrsg.), GUIDI B. (Hrsg.), GUIDI G. C. (Hrsg.): *Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing*, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 44(3), 2006, S. 311-316
- [35] MCDERMID V. (Hrsg.): *Forensics: The Anatomy of Crime*, Profile Books, 2015
- [36] MILLER M. W. (Hrsg.), SHERMAN T. A. (Hrsg.), BRAYMAN A. A. (Hrsg.): *Comparati-*

ve Sensitivity of human and bovine Erythrocytes to sonolysis by 1-MHz ultrasound,
Ultrasound in Medicine & Biology, 2000, S. 1317-1326

- [37] PATTERSON D. (Hrsg.): *Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of aging bloodstains*, Department of Colour Chemistry and Dyeing, 1960, S. 688-689
- [38] REINEX GMBH & Co. KG (Hrsg.): *REINEX Reine Citronensäure, EG-Sicherheitsdatenblatt*, 2013, https://www.reinigungsberater.de/dokumente/entkalker_fuer_kuechenmaschinen_reinex_zitronensaure_500_ml,p-6500410,dl-sicherheitsdatenblatt.pdf, Stand: 24.04.2017
- [39] RONA P. (Hrsg.), KLEIMANN H. (Hrsg.): *Das Praktikum der phsyologischen Chemie, zweiter Teil Blut und Harn*, Verlag von Julius Springer, 1929, S. 105-110, S. 169
- [40] SAKOTA D. (Hrsg.), KANI Y. (Hrsg.), KOSAKA R. (Hrsg.), NISHIDA M. (Hrsg.), MARUYAMA O. (Hrsg.): *Simultaneous determination of hemolysis and hematocrit in extracorporeal circulation by plasma surface reflectance spectroscopy*, Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2013;2013:6764-7. doi: 10.1109/EMBC.2013.6611109, 2013, S. 6764-6767
- [41] SAKURAI H. (Hrsg.), TSUCHIJA K. (Hrsg.), FUJITA Y. (Hrsg.), OKUDA K. (Hrsg.): *Dating of human blood by electron spin resonance spectroscopy*, Naturwissenschaften 76, 1989
- [42] SCHAFER E. D. (Hrsg.): *Ancient science and forensics*, Salempress, 2008
- [43] SCHEFFLER J. (Hrsg.): *Stechapfelform der Erythrozyten*, https://www.dunkelfeld-blutdiagnostik.de/cms/modules.php?name=gallery2&g2_itemId=2425, Stand: 02.08.2017
- [44] SCHMIDT H. (Hrsg.): *Fortschritte der Serologie*, Steinkopff-Verlag Heidelberg, 1933, S. 530-540

- [45] SCHMIDT R. F. (Hrsg.), LANG F. (Hrsg.), HECKMANN M. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*, Springer-Verlag, 2010, S. 477-502
- [46] SCHWARZACHER (Hrsg.): *Determination of the age of bloodstains*, Deutsche Zeitschrift für die gesamt gerichtliche Medizin 15, 1930, S. 374-380
- [47] SCHOENLY K. G. (Hrsg.), HASKELL N. H. (Hrsg.), HALL R. D. (Hrsg.), GBUR J. R. (Hrsg.): *Comparative performance and complementarity of four sampling methods and arthropod preference tests from human and porcine remains at the Forensic Anthropology Center in Knoxville, Tennessee*, Journal of Medical Entomology 44(5), 2007, S. 881-894
- [48] SCHOTSMANS E. M. J. (Hrsg.), DENTON J. (Hrsg.), DEKEIRSSCHIETER J. (Hrsg.), IVANEANU T. (Hrsg.), LEENTJES S. (Hrsg.), JANAWAY R. C. (Hrsg.), WILSON A. S. (Hrsg.): *Effects of hydrated lime and quicklime on the decay of buried human remains using pig cadavers as human body analogues*, Forensic Science International 217, 2012, S. 50-59
- [49] SHIMADZU CORPORATION (Hrsg.): *Benutzerhandbuch UV-1800 Shimadzu Spektrophotometer*, 2008
- [50] SHIN J. (Hrsg.), CHOI S. (Hrsg.), YANG J. (Hrsg.), SONG J. (Hrsg.), CHOI J. (Hrsg.): *Smart Forensic Phone: Colorimetric analysis of a bloodstain for age estimation using a smartphone*, Sensor and Actuators B 243, 2017, S. 221-225
- [51] SMITH K. G. V. (Hrsg.): *A manual of forensic entomology*, Department of Entomology, 1986
- [52] SONNTAG O. (Hrsg.): *Haemolysis as an Interference Factor in Clinical Chemistry*, Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 24, 1986, S. 127-139
- [53] STRASSER S. (Hrsg.), ZINK A. (Hrsg.), KADA G. (Hrsg.), HINTERDORFER P. (Hrsg.), PESCHEL O. (Hrsg.), HECKL W. M. (Hrsg.), NERLICH A. G. (Hrsg.), THALHAMMER S. (Hrsg.): *Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy*, Forensic Science International 170, 2007, S. 8-14

- [54] STEINEGGER E. (Hrsg.), HÄNSEL R. (Hrsg.): *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988, S. 200-202
- [55] TOMELLINI L. (Hrsg.): *De l'emploi d'une table chromatique pour les taches du sang*, Les Archives d'anthropologie criminelle de criminol 14, 1907
- [56] TUCHIN V. V. (Hrsg.), ZHESTKOV D. M. (Hrsg.), BASHKATOV A. N. (Hrsg.), GENINA E. A. (Hrsg.): *Theoretical study of immersion optical clearing of blood in vessels at local hemolysis*, Optics Express 12, 2004, S. 2966-2971
- [57] TUCHSCHERER A. (Hrsg.), CHEMNITZ J. (Hrsg.): *Hämolytische Anämien*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015, S. 1000-1002
- [58] UNIVERSITÄT BIELEFELD (Hrsg.): *Funktionsprinzip eines Absorptionsspektrometers*, <http://www.uni-bielefeld.de/chemie/lehre/basispc/media/Spektrometer/>, Stand: 16.08.2017
- [59] VEST M. (Hrsg.): *Hämolyse und Hämoglobinabbau*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1967, S.665-666

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, 11. September 2017