

Aus dem

Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof.Dr. W.Eisenmenger

Zur Analytik und Diagnostik von "Ketonkörpern" in der Rechtsmedizin

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Tobias Fischer

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Gilg

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stefan Holdenrieder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2009

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	8
1.1. Ketonkörper	8
1.2. Physiologie des Ketonkörperstoffwechsels	10
1.2.1. Ketogenese	10
1.2.2. Normalwerte	12
1.2.3. Ketolyse	14
1.2.4. Elimination	14
1.3. Pathologie des Ketonkörperstoffwechsels	15
1.3.1. Die diabetische Ketoazidose (DKA)	15
1.3.2. Die alkoholische Ketoazidose	18
1.3.3. Isopropanol	20
1.3.4. Nahrungsentzug	21
1.3.5. Körperliche Belastung	21
1.3.6. Hypothermie	22
1.4. Zielsetzung	23
2. Methode	24
2.1. Head-Space Gaschromatographie	25
2.1.1. Materialien	29
2.1.2. Theorie der HS-GC	29
2.1.3. Praxis der HS-GC-Methode (Genauigkeit/ Kontrolle/Fehler)	31
2.2. Bedside-Test für β-Hydroxybutyrat (Abott, Precision Xtra)	31
2.3. Die untersuchten Substanzen im verwendeten HS-GC Verfahren	32
2.3.1. Aceton	32
2.3.2. Acetoacetat	33
2.3.3. β -Hydroxybutyrat	34
2.3.4. Molare Umrechnung	35
2.3.5. β -Hydroxybutyrat-Messung	36
2.3.6. Procedere	38
2.4. Berechnungen	41
3. Ergebnisse	44
3.1. Diagnostik mittels Head-Space Gaschromatographie	44
3.1.1. Aceton	44
3.1.2. Acetoacetat	45
3.1.3. β -Hydroxybutyrat	48
3.2. Elektrochemischer Schnelltest, Mehrschichttechnik,,Precision Xtra“	53
3.3. Semiquantitativer Urin-Teststreifen („Keto-Diabur-Test“)	57
3.4. Praktische Anwendung bei rechtsmedizinischen Fragestellungen	58
3.4.1. Fallbeispiele aus dem Sektionsgut	59
3.4.2. Untersuchungen an Alkoholikern im Entzug	73
4. Diskussion	82
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturverzeichnis	92

7.	Tabellen	96
8.	Lebenslauf	105

Glossar verwendeter Abkürzungen

Ac	Aceton
AcAc	Acetoacetat
ADH	Alkoholdehydrogenase
AKA	alkoholische Ketoazidose
BOHB	Beta-Hydroxybutyrat = β -HBO (Sigma Chemicals)
DKA	diabetische Ketoazidose
DM	Diabetes mellitus
HS-GC	Head-Space-Gaschromatographie
KBR	ketone-body-ratio
KBS	ketone-body-sum

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die Weiterentwicklung und Verfeinerung einer Methode beschrieben, die drei Ketonkörper Aceton, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat quantitativ und qualitativ zu erfassen. Spezifische rechtsmedizinische Anforderungen und Problemstellungen werden hierbei mit berücksichtigt. Des Weiteren erfolgte die Anwendung und Erprobung eines elektronischen Handgerätes zur Messung von β -Hydroxybutyrat. Relevante Stoffwechselentgleisungen dieser Parameter werden am häufigsten im Zusammenhang mit Diabetes mellitus und Alkoholmissbrauch gesehen, ferner auch bei Hunger- und Erschöpfungszuständen und Isopropylalkohol- sowie Salicylatintoxikationen. Nach Feuerlein (Feuerlein, 1998) ist die Lebensprävalenz des Alkoholmissbrauchs mit 13 % der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands anzusetzen, während die Prävalenz aller Formen des Diabetes mellitus mit 4-6% angegeben wird (Foster et al.). Die sich ergebenden Folge- und Begleiterkrankungen haben, sowohl individuell gesundheitlich als auch globalökonomisch, weitreichende Konsequenzen. Eine Folge ist die gutachterliche Betrachtung mit unterschiedlichsten Fragestellungen, sei es versicherungsrechtlich, strafrechtlich als auch zivilrechtlich.

Rechtsmedizinisch ergibt sich ein besonderer Stellenwert aus verschiedenen Gesichtspunkten. Ein Punkt ist die Häufigkeit ungeklärter Todesfälle, insbesondere in Großstädten, bei denen keine Anamnese eruierbar ist und sich auch bei der Obduktion keine pathologisch-anatomische Todesursache fassen lässt. Alkoholranke stellen insbesondere hier – aber auch generell – einen großen Prozentsatz des rechtsmedizinischen Untersuchungsgutes dar. Hier gilt es natürliche von nicht natürlichen Todesfällen abzugrenzen, wobei die Feststellung der Todesursache wesentlich ist. Bedenkt man, dass beispielsweise in der Literatur eine Quote von um die 10% (Pounder et al., 1998) diskutiert wird, die Alkoholikern eine Ketoazidose als Todesursache zuschreibt, wird die erhebliche Bedeutung offensichtlich. Eine erweiterte, differenzierende postmortale Diagnostik zur Klärung ist auch bei Erfrieren, Pflegefehlern, Vernachlässigung von Kindern, als auch bei Behandlungsfehlern im Zusammenhang mit Stoffwechselerkrankungen von Bedeutung.

1.1. Ketonkörper

Unter dem Begriff Ketonkörper versteht man in der Medizin im wesentlichen die drei Substanzen Aceton, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat. Diese haben im Stoffwechsel des Menschen unterschiedliche Bedeutung, je nach Stoffwechsellage und externen Einflüssen. Vor allem sind die beiden letztgenannten energielieferndes Substrat für das zentrale

Nervensystem bei längerer Nahrungskarenz. Beide passieren die Blut-Hirn-Schranke durch erleichterte Diffusion.

Acetoacetat kumuliert im Rahmen des Fettsäurestoffwechsels bei schlechter Kohlenhydratversorgung. β -Hydroxybutyrat wird aus Acetoacetat durch Reduktion in den Mitochondrien gebildet. Diese beiden Substanzen sind energiereiche Substrate, die hauptsächlich von der Leber und dann anderen Organen zum Stoffwechsel zur Verfügung stehen. Aceton ist ein Abbauprodukt von Acetoacetat, aus dem es größtenteils durch spontane Decarboxylation entsteht. Während bei β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat wechselseitige Biotransformation möglich ist, kann Aceton nicht weiter verstoffwechselt werden und somit nur über Urin und Atmung ausgeschieden werden. Dadurch ist es für den typischen Geruch von Patienten mit ketoazidotischen Stoffwechsellagen verantwortlich.

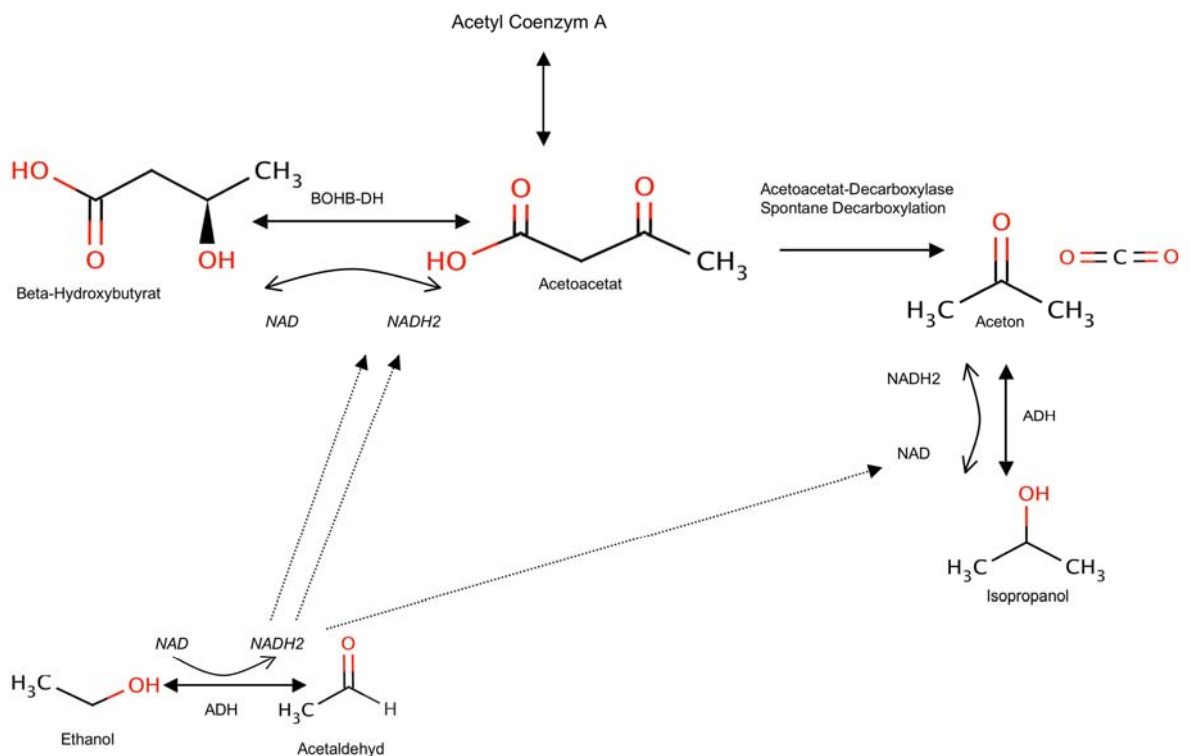
In der Rechtsmedizin spielen die diabetische und alkoholische Ketoazidose als anatomisch nicht direkt erfassbare Todesursachen eine Rolle, weiterhin sind Intoxikationen mit Salicylaten oder Isopropylalkohol mit einem erhöhten Ketonkörperspiegel verbunden, ebenso Nahrungsentzug bis zum Verhungern und Erfrieren (Laffel, 1999).

Hyperketonämische Stoffwechselsituationen werden, neben Alkoholeinfluß und bei Diabetes mellitus, auch während Nahrungsentzug und längerer körperlicher Belastung beschrieben (Ballasse, 1979). Im Rahmen des Alkoholmetabolismus kommt es zu einem hohen intrazellulären Redoxpotential, mit Überschuss an NADH und konsekutiver Beeinflussung vieler NAD/NADH-abhängiger, biochemischer Reaktionspartner, wie auch BOHB und Acetoacetat. In der klinischen Medizin dienen Ketonkörper als differentialdiagnostisches Kriterium zur Unterscheidung metabolischer Azidosen. Weiteres labordiagnostisches Hilfsmittel ist hierbei die Berechnung der Anionenlücke:

Anionenlücke (mmol/l) = $[Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$, Normwert 8 – 16 mmol/l (Thomas and Thomas, 1998)

Diese Differenzierung ist postmortal aufgrund der ausgefallenen zellulären Membranfunktionen und lytischer Veränderungen nicht möglich.

Beide, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat, reagieren bei physiologischen pH-Werten als Säuren, sie dissoziieren vollständig und verursachen damit die Azidose bei derartigen Entgleisungen.



Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob zum einen die Messmethoden für forensische Zwecke, speziell postmortal und bei gelagerten Blutproben anwendbar bzw. verbesserbar sind, zum anderen, ob sich aus einer differenzierten Diagnostik aller drei Ketonkörper Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Störung ergeben. Weiterhin ist folglich von Interesse, ob die differenzierte Messung einen diagnostischen Vorteil erbringt.

1.2. Physiologie des Ketonkörperstoffwechsels

1.2.1. Ketogenese

Voraussetzung für die Ketogenese ist die Lipolyse, durch die freie Fettsäuren in den Kreislauf gelangen. Im Rahmen der β -Oxidation entsteht Acetyl CoA, welches normalerweise im Citrat-Zyklus verwertet wird. Hierzu kondensiert es mit Oxalacetat, welches wiederum aus Pyruvat entsteht. Da Pyruvat nur durch Glykolyse in ausreichendem Maß zur Verfügung

steht, kommt es bei erschöpften Glykogenspeichern zur Verwendung von Oxalacetat in der Gluconeogenese. Folglich fehlt Oxalacetat um Acetyl CoA in den Citrat-Zyklus einzuschleusen. Stattdessen wird AcetylCoA nun der Ketogenese zugeführt. (Laffel, 1999),(Quant, 1994)

Hierbei wird Acetyl CoA durch die 3-Ketothiolase zu Acetoacetyl CoA umgewandelt, durch 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Synthase entsteht HMG CoA. Durch die Spaltung von HMG CoA entsteht Acetoacetat, welches durch die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase zu β -Hydroxybutyrat reduziert wird. Die Reduktion verbraucht NADH unter Bildung von NAD⁺. Somit ist das Verhältnis von β -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat vom Redoxpotential der hepatischen Mitochondrien abhängig.

Wird das Redoxpotential im Rahmen des Ethanolabbaus durch den NAD⁺-Verbrauch mittels Alkoholdehydrogenase (ADH) auf die Seite des NADH verschoben, so kommt es zu einer vermehrten Bildung von β -Hydroxybutyrat, welches nur über die Zwischenstufe Acetoacetat wieder in den energieliefernden Zyklus eingebracht werden kann. Hierzu wäre jedoch das von der ADH beanspruchte NAD⁺ erforderlich. Somit kann es bei chronischer Alkoholbelastung zu einer Anhäufung dieses Ketonkörpers kommen, wodurch eine metabolische Azidose entstehen kann.

Die Kontrolle der Ketogenese ist im wesentlichen von drei Enzymen abhängig: der hormon-sensitiven *Lipase* der peripheren Adipozyten, der *Acetyl CoA Carboxylase* und der mitochondrialen *HMG CoA Synthase*. Die Lipase und Carboxylase werden von Insulin, Glucagon und Adrenalin kontrolliert. Insulin hemmt die Ketogenese, d.h. die Carboxylase wird aktiviert, während die Lipase gehemmt wird. Glucagon und Adrenalin fördern hingegen die Ketogenese mit entsprechend entgegengesetzten Effekten.

Die Lipase (Triglycerid-Lipase) katalysiert die Entstehung von Diglyceriden aus Triglyceriden. Diese werden weiter zu freien Fettsäuren abgebaut und hiermit der Ketogenese zugänglich. Die Carboxylase katalysiert hingegen die Umsetzung von AcetylCoA zu *MalonylCoA*, dem primären Substrat für die Biosynthese der Fettsäuren. Der Spiegel korreliert in der Leber direkt positiv mit der Rate der Fettsäuresynthese. Das heißt umgekehrt, je weniger MalonylCoA zur Verfügung steht, desto mehr erfolgt ein Transport von freien Fettsäuren in die Mitochondrien mittels des sog. Carnitin-shuttles. Hohe Konzentrationen von MalonylCoA hemmen die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT 1). Die „Down-Regulation“ der Ketogenese durch Insulin erfolgt durch Dephosphorylierung der hormon-sensitiven Lipase und der AcetylCoA Carboxylase. Dadurch reduziert sich die Konzentration des Grundsubstrates der Ketogenese. Die Aktivierung der Carboxylase fördert die Produktion von MalonylCoA und senkt die Rate mit der freie Fettsäuren durch die mitochondriale Membran transportiert werden um dort für β -Oxidation und Ketonkörperproduktion zur Verfügung zu stehen.

Glucagon löst die Phosphorylation von Lipase und AcetylCoA Carboxylase durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase aus, wodurch die Ketogenese in Gang kommt. Die Adipozyten setzen freie Fettsäuren ins Blut frei, wo sie zur Leber und anderen Geweben gelangen. In der Leber sinkt der Spiegel von MalonylCoA durch die phosphorylierte Carboxylase. Im Gegenzug erhöht sich die Aufnahme von freien Fettsäuren durch die Mitochondrien.

Die *mitochondriale HMG CoA Synthase* ist als drittes Enzym an der Kontrolle beteiligt. Stimuliert wird sie durch Hungern und eine sehr fettreiche Ernährung, gehemmt durch Insulin. Die Modulation erfolgt durch Einfluss auf die mRNA-Produktion und durch reversible Succinylierung des Enzyms selbst. Dabei senkt Glucagon die Succinylierung und aktiviert somit die HMG CoA Synthase (Quant, 1994). Erhöhte HMG CoA Synthase Aktivität führt zur Produktion von Ketonkörpern.

Die Synthese der Ketonkörper läuft hierbei immer über die „Urform“ Acetoacetat: Entweder über eine Reduktion zu β -Hydroxybutyrat oder ein Einschleusen in den Krebs-Zyklus. Weitere Möglichkeit ist eine Anhäufung von Aceton, welches einerseits spontan aus Acetoacetat entsteht, als auch durch den enzymatischen Abbau des Ausgangsstoffes Acetoacetat durch die Acetoacetat-Carboxylase. Letzteres geschieht allerdings nur in sehr geringem Umfang. Eine KBR (Ketone-body-ratio) mit Tendenz zu Seiten des Acetoacetats ist entscheidend vom Redoxpotential der Zelle abhängig. Es muss genügend NAD⁺ vorhanden sein, um das Gleichgewicht in diese Richtung zu verschieben. Aceton selbst wird nicht entscheidend metabolisiert, es wird über die Nieren ausgeschieden und zum Teil abgeatmet. Ein kleiner Teil wird durch Cytochrom-Systeme abgebaut.

(Laffel) ,(McGarry and Foster),(Fery and Balasse, ; Fery and Balasse, ; Fery and Balasse, ; Fery et al.), (Fukao et al.)

Zusammengefasst ergibt sich, dass das Insulin-Glucagon Verhältnis der im Vordergrund stehende Parameter der *Ketonkörpersynthese* ist, während die „ketone-body-ratio“ (KBR) vor allem durch das Redoxpotential der mitochondrialen Matrix bestimmt wird. Von diesen biochemischen Gegebenheiten ausgehend ergeben sich die zu betrachtenden Störungen des Fettsäure- bzw. Energiesubstratmetabolismus.

1.2.2. Normalwerte

In der Literatur gelten als physiologische Konzentrationen der Ketonkörper die Werte in: Ciba Geigy Tabellen 1996 / Thomas, Labor und Diagnose (Thomas and Thomas)

Aceton (nüchtern)	Acetoacetat (nüchtern)	β-Hydroxybutyrat (nüchtern)

1,6 – 5,1 mg/l (28 –88 µmol/l)	1,8 –7,8 mg/l (18 – 76 µmol/l)	5,8 –17,1- mg/l -28,1 mg/l (Thomas) (56-164 µmol/l)
Aceton (nicht nüchtern)	Acetoacetat (nicht nüchtern)	β-Hydroxybutyrat (nicht nüchtern)
Bis 1,7 mg/l (30 µmol/l)	0,5-4,6 mg/l (5 – 45 µmol/l)	1,4 – 9,9 mg/l (13 –95 µmol/l)

Tabelle 1.1

Dabei ist anzumerken, daß bei *Neugeborenen* erheblich höhere Konzentrationen gefunden werden, bei β-Hydroxybutyrat im Durchschnitt 500 µmol/l, bei Acetoacetat 250 µmol/l. Weiterhin sind die Werte über den Tag hinweg betrachtet stark schwankend, mit einem Maximum von teilweise bis zu 500 µmol/l um Mitternacht herum. Dies führt man am ehesten auf die Nahrungskarenz zurück, wobei Neugeborene andere Adaptionsmechanismen zu haben scheinen.

Die Normwerte für Aceton lassen sich in der Literatur bei Kontrollgruppen bestätigen und auch bei Erwachsenen sind durch Fasten erhöhte Werte beschrieben. (Owen et al., 1979), (Jones, ; Jones et al.).

Diese Normalwerte sind jedoch weit entfernt von krankheitsbedingt erhöhten oder gar pathologischen Befunden, da die meisten Autoren für β-Hydroxybutyrat erst Werte ab 500 µmol/l als erhöht und Werte ab 2500 µmol/l als pathologisch ansehen. Andere definieren Hyperketonämie bei Spiegeln > 1,0mM (=1000 µmol/l) und die Ketoazidose wird ab einem Spiegel von 3,0 mM als relevant angesehen (Iten and Meier).

Diese Referenzwerte aus der Literatur sind überwiegend mit enzymatischen Methoden an frischen Proben gewonnen worden. Hierbei wird fotometrisch der NADH-Abbau gemessen. Der Einfluss der Analysenmethoden auf die Grenzwerte ist z. Zt. nicht näher zu eruieren, da für die enzymatisch-gaschromatographisch gekoppelte Methode keine ausreichend großen Fallzahlen vorliegen.

Ausgehend von eigenen Erfahrungen in Obduktionsfällen dürften diese Werte im Schnitt etwas niedriger liegen, bedingt durch postmortalen enzymatischen Abbau, wobei es auch durch die Flüchtigkeit des Acetons zu Verlusten kommen dürfte. Zieht man allerdings in Betracht, welche hohen Werte für diagnostisch relevante Aussagen erforderlich sind, kann man dies als vernachlässigbar bezeichnen (Thomsen et al.) .

1.2.3. Ketolyse

Hauptsächlicher Abbauweg bei normalen Spiegeln und physiologischer Stoffwechsellage ist die Ketolyse. Darunter versteht man die Bereitstellung und den Verbrauch von Ketonkörpern als Energielieferanten. Insbesondere das zentrale Nervensystem ist bei Glucosemangel auf die durch die Leber bereitgestellten Ketonkörper angewiesen, da die Ketolyse im ZNS selbst nur auf sehr geringem Niveau stattfindet. Es gibt Hinweise, dass Astrozyten zur Ketogenese/Ketolyse fähig sind (Laffel). Die Ketolyse beruht auf 2 Schritten. Zuerst wird durch die Succinyl-CoA-Oxalsäure-Transferase (SCOT) aus Acetoacetat Acetoacetyl-CoA wiederhergestellt. Dann erfolgt die Abspaltung einer Acetylgruppe durch die MethylacetoacetylCoA – Thiolase (MAT), um AcetylCoA zu gewinnen. Dieses wird in den Zitronensäurezyklus eingeschleust.

Durch die SCOT ist die Umsetzungsrate der Ketolyse vorgegeben. Die Aktivität dieses Enzyms ist in Herz und Niere besonders hoch, gefolgt von ZNS und Skelettmuskel. Niedrige Aktivität findet sich in der Leber. Durch die größere Masse bedingt findet sich in den Muskeln der größte Umsatz im Körper. Hohe intrazelluläre Spiegel von Acetoacetat (>5 mmol/l) hemmen die Aktivität der SCOT (Laffel), (Olpin). Dadurch kommt es zu dem häufig beobachteten Anstieg an Ketonkörpern während der ersten Tage von Nahrungskarenz, trotz relativ konstanter Ketogenese in dieser Zeit. Die beschriebenen Werte während des Nahrungsentzugs sind denen der alkoholischen Ketoazidose ähnlich (Nicolaou et al., 1999), sie reichen von 7 mmol/l bis 10-12 mmol/l (Nicolaou et al.), (Fery and Balasse). In der Regel wurde bei diesen Arbeiten Acetoacetat und β - Hydroxybutyrat gemessen, wobei sich hier unterschiedliche Betrachtungsweisen zeigen. Zum einen wird isoliert BOHB als Ketonkörper gewertet, zum Teil AcAc oder AcAc und Aceton.

1.2.4. Elimination

Aufgrund von Versuchen und einer Literaturrecherche bezeichnet A.W.Jones (Jones, 2000) den Abbau von Aceton als relativ langsam, da er überwiegend auf der Exkretion durch die Lunge und die Nieren beruht und nur zu einem sehr geringen Teil auf der Oxidation durch Cytochrom P-450 Enzymsysteme. Des Weiteren ist Aceton sehr gut in Fett löslich, was die Äquilibration zwischen Plasma als Transportmedium zu den Ausscheidungsorganen und dem Fettgewebe nochmals verlangsamen dürfte. Hier stellt sich die Frage ob die langen Halbwertszeiten mehr durch diese Verteilungseffekte zu erklären sind als durch die Dauer der reinen Elimination, die zumindest für die Lunge nur auf Diffusion

beruht. Jones gibt als Rechengrundlage eine Eliminationshalbwertszeit von 17- 27 Stunden an. (Jones)

Für Acetoacetat ist die spontane Decarboxylierung als Hauptabbauweg unter Umgehung von energieliefernden Prozessen beschrieben. Ebenso erfolgt ein spezifischer Abbau durch eine Decarboxylase. Sonst erfolgt die direkte Elimination von β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat über glomeruläre Filtration, die Reabsorption beträgt hierbei allerdings 75-85%. Es ergibt sich daher eine quantitative Beziehung zwischen Ketonämie und Ketonurie, allerdings nur bei intakter Nierenfunktion (Kitabchi and Wall). Die Konsequenzen für die Spätstadien des Diabetes mellitus mit Nierenschäden sind naheliegend, eine Todesursache „metabolische Azidose“ im Sinne einer Ketoazidose sollte in den differentialdiagnostischen Erwägungen insofern im Vordergrund stehen.

β -Hydroxybutyrat wird über die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in Acetoacetat umgewandelt. Hierbei sei nochmals erwähnt, dass β -Hydroxybutyrat nur über diese Zwischenstufe abgebaut werden kann.

1.3. Pathologie des Ketonkörperstoffwechsels

1.3.1. Die diabetische Ketoazidose (DKA)

Die diabetische Ketoazidose gilt als ernsthafte Komplikation des Diabetes mellitus. Sie ist durch erhöhte Glukosekonzentrationen, erhöhte Ketonkörperspiegel und eine dadurch bedingte metabolische Azidose gekennzeichnet. Ursache dafür ist beim Typ 1 Diabetiker ein absoluter bzw. beim Typ 2 Diabetiker ein in der Regel sehr hoher relativer Insulinmangel. Weiterhin addiert sich der Effekt von gegenregulatorischen Hormonen wie Glucagon dahingehend, dass es zu erhöhter Lipolyse in den Adipozyten und vermehrter Ketogenese in der Leber kommt. Es werden wesentlich mehr Fälle bei Typ 1 Diabetikern beschrieben, wobei diese Gruppe auch besonders anfällig ist für Entgleisungen nach der Akutbehandlung. Typ 2 Diabetiker zeigen demgegenüber eine bessere, stabilere Stoffwechsellage nach einer durchgemachten diabetischen Ketoazidose (Chansky et al.). In amerikanischen Aufnahmestationen macht die DKA 8 bis 28 Prozent aller zugewiesenen diabetischen Patienten aus (Chansky et al.). Bei älteren Patienten ist die Mortalität wegen begleitender Nierenerkrankungen oder begleitenden Infektionen deutlich höher (Malone et al.). Ausgelöst wird die Ketoazidose durch unterlassene Insulingaben, inadäquate Insulinmengen, Diätfehler, Infektionen, sowie durch das Neuauftreten eines Diabetes. Weiterhin sind

Schwangerschaft, Hyperthyreoidismus, Schlaganfall, Myokardinfarkte, Pankreatitis und Lungenembolien als stressverursachende und somit eine DKA begünstigende Begleitumstände bei Diabetes mellitus bekannt (Chansky et al.). Auch andere Faktoren können zur Manifestation beitragen, z.B. der physische und psychische Stress bei chirurgischen Eingriffen. Die diabetische Ketoazidose ist zur Zeit mit einer Mortalität von 4-5% verbunden, wohingegen sie früher, ohne adäquate medizinische Behandlung, mit einer Mortalität von 30 % (im Jahr 1930) bis 100 % (1886) verbunden war (Kitabchi and Wall). Die als kausal todesursächlich beschriebenen Komplikationen sind zerebrale Ödeme, ARDS und thromboembolische Geschehen. Insbesondere letzteres legt nahe, dass die Mortalität sekundär durch die Hospitalisation und Immobilisation zumindest mitbedingt ist. Für die Diagnose selbst gibt Lebovitz (Lebovitz) folgende Kriterien an:

- Hyperglykämie
- positiver Ketonkörpernachweis,
- arterieller Blut-pH $\leq 7,30$ und bzw. oder
- Bikarbonatwerte ≤ 15 mmol/l
- Blutzucker $\geq 11,1$ mmol/l

Die Blutzuckerwerte werden in einem Bereich von 11,1 mmol/l bis 55,6 mmol/l (ca. 200 mg% bis 1000 mg%) beschrieben, wobei nur ein geringer Anteil mit Werten im niedrigen Bereich auffällig wird. Es fällt hier, wie auch bei anderen Literaturstellen auf, dass eine Differenzierung zwischen β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat nicht stattfindet. Positiver Ketonkörpernachweis bezieht sich meist auf β -Hydroxybutyrat, manchmal Acetoacetat, selten werden beide Parameter gemessen. Da offensichtlich oftmals semiquantitative Tests für den Nachweis im Urin durchgeführt werden, erklärt sich dadurch die Formulierung „Positiver Ketonkörpernachweis“. Die Grundfrage, mit der sich auch diese Arbeit beschäftigt, ob die Summe oder die Einzelwerte relevant sind, lässt sich aus der vorliegenden klinischen Literatur zunächst nicht ohne weiteres beantworten. Für den klinischen Alltag wird offensichtlich der „positive“ Nachweis als ausreichend angesehen.

Andere Autoren verknüpfen „Ketoazidose“ mit Ketonkörpern >3,0 mmol/l (Foster et al.).

Vereinfacht gesagt ist die DKA die Antwort des Körpers auf das Verhungern auf zellulärer Ebene, verursacht durch einen relativen Insulinmangel und gegenregulatorischen, katabolen Hormonüberschuss. Tendenziell lässt sich hier festhalten, dass gefährliche und todesursächliche DKA hauptsächlich bei Typ 1 Diabetikern vorkommen.

Ist es einmal zu einem Insulinmangel gekommen, kommt es durch das Überwiegen von Glucagon und weiteren Hormonen wie Cortisol, Katecholaminen und Wachstumshormonen

zur Lipolyse in den Adipozyten und zur Ketogenese in der Leber. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg von freien Fettsäuren im Blut. Diese Fettsäuren stellen für die Ketogenese das primäre Substrat dar. Gleichzeitig ist durch den Hormonstatus die Speicherung von freien Fettsäuren unterdrückt. Folglich kommt es in den Mitochondrien zur Bildung von Acetoacetat, das in den Blutkreislauf gelangt. Zusätzlich verschiebt sich das *Verhältnis von β -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat* während einer *diabetischen* Ketoazidose von normal 1:1 auf 3 :1 , maximal beschriebene Werte gehen bis 4,8:1 bzw. bis knapp 6:1 (Owen et al.), (McGarry and Foster), (Cahill). Pathophysiologische Ursache hierfür ist das hohe Redoxpotential der Mitochondrien bei Patienten mit diabetischer Ketoazidose, da die laufende β -Oxidation durch Acetyl CoA- Bildung ständig NADH regeneriert und dieses folglich für die Bildung von β -Hydroxybutyrat zur Verfügung steht (Nicolaou et al., 1999). Auch wenn eine reduzierte Aufnahmekapazität der Muskelzellen für Ketonkörper durch den Insulinmangel beschrieben ist (Foster et al.), so gilt vor allem die Überproduktion als primärer Faktor für die exzessiv hohen Plasmaspiegel von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat (Williamson).

Da sowohl Acetoacetat als auch β -Hydroxybutyrat als starke organische Säuren reagieren wird die Pufferkapazität von Serum und Geweben bei weitem überschritten, es kommt zur metabolischen Azidose. Das aus Acetoacetat entstehende Aceton verursacht den typischen aromatischen Atemgeruch der betroffenen Patienten.

Die erweiterte Diagnostik der Patienten zeigt Hyperglykämie, Ketonämie, Ketonurie, Azidose, Dehydratation, Hyperosmolarität und eine vergrößerte Anionenlücke. Die Glucosekonzentration ist in der Regel > 300 mg/dl (16,7 mmol/l), ist aber unter Umständen z.B. bei nüchternen Patienten, Schwangeren oder auch nach exzessivem Erbrechen nicht so deutlich erhöht und insgesamt niedriger als beim diabetischen Koma. Bei jüngeren Patienten mit intakter Niere und hoher glomerulärer Filtrationsrate ermöglicht eine gute Hydratation die vermehrte renale Ausscheidung der Glucose. Hierbei liegen die Glucosewerte häufiger < 200 mg/dl (11,1 mmol/l) (Thomas and Thomas). Während der Behandlung kommt es, aufgrund der wechselseitigen Biotransformation zwischen AcAc und β -Hydroxybutyrat, zu einem ungleich schnelleren Abbau von β -Hydroxybutyrat, während die Acetoacetat – Spiegel noch auf hohem Niveau verbleiben bzw. erst langsam zu fallen beginnen. Auch ein leichter Anstieg unmittelbar nach Verabreichung von Insulin ist beschrieben. Daraus ergibt sich zum einen, dass das Verhältnis der beiden zueinander *unter Therapie* oder bei abklingender Ketose nicht mehr einfach schematisiert werden kann. Zum anderen liegt hier die Gefahr, dass die erhaltenen Messwerte überinterpretiert werden, so dass der bereits zurückgehende Gesamtspiegel nicht ausreichend berücksichtigt wird. Generell ergibt sich daraus, dass es sinnvoll ist, alle 3

Parameter des Ketonkörperstoffwechsels für eine bessere Befundinterpretation, Diagnostik und Therapie zu erheben.

Zur Differentialdiagnose von hyperosmolarem und ketoazidotischem Koma

Das hyperosmolare, nicht-ketoazidotische Koma ist definitionsgemäß durch Glucosewerte $>600\text{mg/dl}$, Hyperosmolarität von $>310\text{ mOsmol/l}$ und geringer bis fehlender Erhöhung der Ketonkörper mit allenfalls minimaler Azidose charakterisiert. Diese Komaform wird bei 10 – 20 % aller schweren hyperglykämischen Entgleisungen beobachtet. Betroffen sind hierbei bevorzugt – meist ältere – Patienten mit bisher unbekanntem Diabetes mellitus, selten Jugendliche, Kinder oder gar Säuglinge. Ein prädisponierender Faktor scheint hierbei das gestörte Durstempfinden älterer Menschen zu sein, mit einhergehendem Volumendefizit mit fehlender Kompensationsmöglichkeit. Der relative, nicht absolute Insulinmangel scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen, da die Lipolyse bereits bei niedrigeren Insulinkonzentrationen gehemmt wird, als sie zur Glucoseaufnahme in die Zelle notwendig ist. Beim hyperosmolaren Koma kommt es häufiger zu Krampfanfällen fokaler und generalisierter Art. Nackensteifigkeit wird hierbei in Begleitung von normalen Liquorbefunden beobachtet.

In einer multizentrischen Studie von Glaser et al (2001) ist die diabetische Ketoazidose bei Kindern mit einer Mortalität von 40 – 90% verbunden (Glaser et al.). Todesursache ist dabei mit einer Häufigkeit von 50- 60% das zerebrale Ödem mit folgender oberer bzw. unterer Einklemmung. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines zerebralen Ödems werden initial erhöhte arterielle Kohlendioxidpartialdrücke, initial erhöhte Harnstoffkonzentrationen im Serum, sowie eine erhöhte Bikarbonatkonzentration beschrieben. Dies legt nahe, dass eine verspätete Intervention oder schnelle Progredienz der Stoffwechselentgleisung eine schlechte Prognose nach sich ziehen, umgekehrt dass die angeführten Stoffwechselfparameter als direkte Folge der Ketoazidose zu betrachten sind. Die sich entwickelnde Azidose überschreitet im Verlauf die Kompensationsmöglichkeiten des kindlichen Organismus und führt zu den aufgeführten fatalen Folgen.

1.3.2. Die alkoholische Ketoazidose

Die zweithäufigste Form der Ketoazidose, nach der diabetischen Form, ist mit der Aufnahme von Ethanol verknüpft. Auf 4 diabetische Formen kommt eine alkoholisch bedingte Ketoazidose (Thomas and Thomas). Sie wird nach Alkoholexzessen und – am häufigsten – bei chronischen Alkoholikern beobachtet. Meist folgt einer Alkoholintoxikation eine nahrungskarente Phase, je nach Adaptation des Organismus mit Entzugssymptomatik oder schlichtweg nur mit Korrektur des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Die fehlende

Nahrungsaufnahme wird zum Teil auf gastrointestinale Probleme zurückgeführt, darunter Gastritis, Hepatitis und Pankreatitis, aber auch auf die Entzugssymptomatik selbst. Das aufgenommene Ethanol führt bei seinem Abbau über Acetaldehyd zu Acetat zunächst zu einem Anstieg des Redoxpotentials der Hepatozyten. Der Überschuss gebildeten NADH's hat Auswirkungen auf zahlreiche NAD/NADH abhängige, biochemische Reaktionspartner und entsprechende Verschiebung von Reaktionsgleichgewichten. Beispielsweise wird dann bei NADH-Überschuss und reduktiver Kapazität vermehrt Pyruvat zu Laktat und Oxalacetat zu Malat reduziert, aber eben auch Acetoacetat zu β -Hydroxybutyrat, oder Aceton zu Isopropanol. Zur Reoxidation dieses NADH, damit es wieder als Reduktionsmittel zur Verfügung steht, verbraucht die Zelle Pyruvat und Oxaloacetat zu Laktat bzw. Malat. Da diese beiden Energieträger Substrate der Gluconeogenese sind, kommt es zur Hemmung dieses Stoffwechselweges. (Fulop et al.), (Halperin et al., 1981)

Dieser Effekt führt über verschiedene Zwischenstufen auch zu erhöhten Spiegeln von Glucagon, Cortisol und Katecholaminen, die aufgrund des meist vorhandenen Volumenmangels und einer Entzugssymptomatik vermehrt ausgeschüttet werden. Durch das „NADH-lastige“, negativierte Redoxpotential der Zellen kommt es konsekutiv zu einer Verschiebung der „ketone-body-ratio“ (KBR) auf die Seite des β -Hydroxybutyrat. Hiervon sind etwa 10% der Patienten betroffen. (Thomas and Thomas)

Diese Stoffwechselentgleisung wurde von Dillon 1940 erstmals beschrieben (Dillon et al.). Die Patienten, fast immer Alkoholiker, zeigen oft eine typische Anamnese. Einer Periode von exzessivem Alkoholkonsum und geringer Nahrungsaufnahme folgt die Entwicklung von abdominalen Schmerzen und fortgesetztem Erbrechen. Ursächlich finden sich oftmals eine Pankreatitis, Gastritis oder akute Hepatitis. Oft sistieren die Patienten ihre Alkoholaufnahme, was erklärt, dass bei der initialen Diagnostik der Patienten, sei es klinisch oder postmortal, oftmals kein oder allenfalls eine geringe Menge Alkohol im Blut nachgewiesen werden kann. Die β -Hydroxybutyrat –Spiegel sind typischerweise sehr hoch, während der Acetoacetat - Spiegel meist nur moderat erhöht ist (Thompson et al.). Weitere differentialdiagnostische Hinweise ergeben sich bei forensischen Untersuchungen durch erhöhte Acetonspiegel, fehlende anatomisch-pathologische Todesursachen, oder auch durch das oft unerwartete Ableben des Patienten. Auslösend für die Entgleisung scheint ein relativer Insulinmangel, durch den Ethanolabbau gehemmte Gluconeogenese, sowie eine zusätzliche adrenerge Stimulation durch Dehydratation und Nahrungskarenz zu sein (Pounder et al.).

Aus den in der Literatur beschriebenen Werten für die Ketonkörpermessungen bei der alkoholischen Ketoazidose ergibt sich folgendes Bild:

Thomsen gibt den unteren Grenzwert für die **Gesamtketone** mit 0,531 mmol/l an, während Mitchell den Begriff einer Ketoazidose erst ab 3,0 mmol/l verwendet (Thomsen et

al.), (Mitchell et al.). Caspar gibt als kritischen β -Hydroxybutyrat-Wert 4,0 mmol/l an, während Brinkmann Acetonwerte über 90 mg/l (1,55 mmol/l) als Hinweis wertet. (Caspar et al.), (Brinkmann et al.). Bei Iten werden Werte ab 2,5 mmol/l als forensisch-diagnostisch verwertbar angesehen (Iten and Meier).

Hier ist bereits zu sehen, daß unterschiedliche Ketonkörper zur Diagnostik bestimmt und benutzt werden.

1.3.3. Isopropanol

Isopropanol, synonym auch Propanol-2, findet als Desinfektionsmittel, Reinigungsmittel und unter anderem auch als Frostschutzmittel Anwendung. Da es als relativ preiswertes Mittel in einer Vielzahl von industriell hergestellten Fertiglösungen enthalten ist, ergibt sich eine geradezu ubiquitäre Verbreitung, die differentialdiagnostisch bei erhöhten Acetonspiegeln ebenfalls in Erwägung gezogen werden sollte. Grund ist die direkte Metabolisierung mittels ADH unter Bildung von NADH zu Aceton. Eine akzidentelle Aufnahme von Isopropanol muß daher als Differentialdiagnose erhöhter Acetonspiegel berücksichtigt werden. Auch durch die präoperative Hautdesinfektion kann es zu relevanten Werten im Blut kommen, allerdings sind diese in der Regel nur im Rahmen von Begleitstoffuntersuchungen bei Alkoholkonsum von Bedeutung (Wittmann et al.). Eine hohe Resorption von 80 % innerhalb der ersten halben Stunde nach oraler Ingestion erhöht sich auf nahezu 100% in den folgenden eineinhalb Stunden. Es folgt ein Abbau durch die Alkoholdehydrogenase mit der halben Eliminationsrate im Vergleich zu Ethanol. Hierbei oxidiert die ADH das Propanol-2 direkt zu Aceton. Der Abbau führt, ebenso wie der von Ethanol, zu einer Verschiebung des NAD/NADH Gleichgewichts in Richtung der reduzierten Form. Auch hier kann es durch Hemmung der Gluconeogenese zu einer Hypoglykämie kommen. Isopropanol wird als zentralnervös hemmende Substanz beschrieben, mit der doppelten Toxizität im Vergleich zu Ethanol. Ähnlich ist ebenfalls die hervorgerufene Symptomatik, sie umfasst Schwindel, Koordinationsstörungen, Kopfschmerzen, Blutdruckabfall, Erbrechen und Hypothermie, im schlimmsten Fall bis hin zu Koma und Tod. Bemerkenswert ist, dass die Symptomatik durch das gebildete Aceton, das nur langsam ausgeschieden wird, u.U. lange anhalten kann (Rezvani and Alcohols and, 1992) .

1.3.4. Nahrungsentzug

Die Industriegesellschaft kennt den Nahrungsentzug fast nur noch in freiwilliger Form, das Hungern beschränkt sich somit fast ausschließlich auf „Fasten“. Psychosomatische Erscheinungsformen, durch Erkrankungen bedingte Nahrungskarenz und auf Pflege angewiesene Menschen sind des Weiteren aufzuführen. Rechtsmedizinischer Aspekt ist häufig auch eine hilflose Lage von - nicht selten alkoholisierten - Verletzten, mit Nahrungsreduktion und teilweise auch begleitender Unterkühlung. Die Konstellation wäre eigentlich unter einem eigenen Begriff zu führen, da sie typisch ist für eine Vielzahl von rechtsmedizinisch relevanten Auffindungssituationen. Auch sind derartige Entgleisungen häufig komplizierende Begleitumstände einer auslösenden Ursache, wie z.B. eines Schlaganfalls.

Erhöhte Werte von Aceton sind dabei schon lange bekannt (Reichard et al., 1979). Sie erklären sich zwanglos aus der erhöhten Lipolyse bei fehlender Nahrungszufuhr. Die Lipolyse setzt bereits frühzeitig ein, abhängig vom Glucagonspiegel (Clutter et al., 1980). Hier sind β -Hydroxybutyrat Werte von bis zu 5 mmol/l beschrieben. Mitchell beschreibt einen allmählichen Anstieg der „KBR“ im Lauf der ersten Woche, anfänglich misst er ein Verhältnis von 1:1, welches auf 5-6 :1 steigt (Mitchell et al., 1995). Bemerkenswerterweise können Ketonkörper bis zur Hälfte des basalen Energiesubstratflusses ausmachen (Mitchell et al.).

Sind die Glykogenreserven erschöpft, bleibt dem Körper, neben der Gluconeogenese, als wesentliche Energiequelle nur die β -Oxidation von Fettsäuren. Allerdings benötigt das zentrale Nervensystem einige Tage Zeit um sich auf den alternativen „Brennstoff“ der gebildeten Ketonkörper umzustellen.

1.3.5. Körperliche Belastung

Körperliche Anstrengung im aeroben Bereich führt zur Utilisation von Glykogen und Fettreserven. Im so genannten „steady state“ verbrennt der Körper bevorzugt Fettsäuren, unter Bildung von Ketonkörpern. Bei 65% der maximalen Sauerstoffaufnahme erreichen Trainierte einen Fett-Umsatz von bis zu 0,5 g/min. Eine Kohlehydrataufnahme senkt den Umsatz von Fettsäuren erheblich (Jeukendrup, 2005). Insbesondere längerdauernde körperliche Aktivität - über 30 Minuten - geht mit einem leichten Anstieg der Ketonkörper einher, welcher wesentlich deutlicher ausgeprägt ist bei vorbestehenden Hungerzuständen, wie z.B. unmittelbar nach dem Aufwachen. Bei nur über Nacht nüchternen Probanden sind Werte für die Ketonkörpersumme bis zu 0,2 mmol/l beschrieben, hingegen für länger

nüchterne, belastete Probanden Werte bis 0,5 mmol/l. Hierbei steigt das β -Hydroxybutyrat in der Regel erst nach der Belastung deutlich an, während Acetoacetat bereits unter der Belastung deutlich erhöhte Werte zeigt. Das Verhältnis von β -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat (KBR) übersteigt hierbei in der Regel nicht 2:1 und steigt mit dem Ende der Belastung auf 4:1.(Johnson et al., 1969; Krebs et al., 1969),(Akinola et al., 2001)

1.3.6. Hypothermie

Zur Bildung von Ketonkörpern bei Unterkühlung, auch mit Todesfolge, gibt es wenig Literatur. Die eigenen Erfahrungen in der rechtsmedizinischen Routine , wobei es sich meist um kombinierte pathogenetische Faktoren handelt, werden von der Literatur gestützt (2006). Meist handelt es sich um den zusätzlichen Einfluß von Drogen, Alkohol und/oder Vorerkrankungen, hier ist insbesondere Diabetes im Vordergrund stehend. Weitere, häufigere Umstände sind psychiatrische Erkrankungen und körperliche Einschränkungen, z.B. bedingt durch cardiale oder orthopädische Vorerkrankungen (2005). Laut Kernbach-Wighton (Kernbach-Wighton G. , 2004) ergibt sich oftmals das Problem, dass zwar Aceton – als auch Isopropanol- bei ethanolnüchternen erhöht ist, aber manifolde differentialdiagnostische Überlappungen bestehen, die keine eindeutige Interpretation zulassen. Eigene Untersuchungen an Leichen, die aufgrund der Obduktionsergebnisse (Wischnewski-Flecken, Psoas-Einblutungen, Rötung über den grossen Gelenken) und der Vorgeschichte mit hoher Wahrscheinlichkeit unter Mitbeteiligung oder aufgrund einer Hypothermie verstorben sind, zeigen in der Regel nur pathologische Werte für Ketonkörper bei Alkoholismus oder längerer Nahrungskarenz, z.B. aufgrund von vorbestehender Hilflosigkeit. Dennoch lässt eine Zentralisation des Kreislaufs mit dadurch bedingtem geringeren Verbrauch von Ketonkörpern in der Peripherie durchaus an einen Anstieg denken, jedoch erscheint dieser nur signifikant , wenn andere pathologische Prozesse dies verstärken. Z.B. scheint das Auftreten von erhöhten Aceton- bzw. Ketonkörpern an die Dauer des Erfrierungsvorgangs geknüpft zu sein. Die von Teresinski (Teresinski et al., 2002) gestützte These, dass die durch Alkohol bedingten antiketonämischen (!) Effekte mit für den Tod durch Hypothermie verantwortlich seien, lassen sich so nicht ohne weiteres mit der bisherigen Literatur in Einklang bringen, da der Abbau von Ethanol den Ketonkörpern Spiegel in der Regel ansteigen lässt (Teresinski et al., 2005). Bislang sind – soweit in gängigen Datenbanken überprüfbar - keine Arbeiten publiziert, die differenzierte Untersuchungen der einzelnen Ketonkörper bei derartigen Vorgängen betrachten.

1.4. Zielsetzung

Bislang wurde aufgrund analytischer Schwierigkeiten und des relativ hohen analytischen Aufwandes häufig nur ein Ketonkörper bestimmt. Die Überlegung war somit, die Analysetechnik in Anlehnung an vorbestehende Arbeiten (Felby and Nielsen, 1994), so zu verbessern, dass ein vertretbarer Arbeitsaufwand kombiniert wird mit hinreichender analytischer Präzision. Daraus sollte ein standardisiertes Vorgehen resultieren, das Effizienz und Qualität vereint. Hierbei soll primär die Messung aller drei Ketonkörper erfolgen, um die einzelnen Messwerte bzw. ihre Kombination bezüglich ihrer Aussagekraft bewerten zu können. Die Fragestellungen sollen zum einen über analytisch-experimentelle Ansätze, zum anderen über die Auswertung von Obduktionsfällen und über Messungen bei Alkoholikern geklärt werden. Die Zielsetzung lässt sich somit wie folgt gliedern:

- Analytische Problematik
 - Differenzierte Messung aller 3 Metaboliten des Ketonkörperstoffwechsels
 - Standardisierung der Messmethodik/Analytik
 - Effizientere und sichere Diagnostik bei rechtsmedizinisch relevanten Fragestellungen
 - Alternative Meßmethode
 - Elektrochemischer Schnelltest
- Evaluation
 - HS-GC, Schnelltest
 - Obduktionsfälle
 - Klinisch an Alkoholikern

2. Methode

Für die Bestimmung von Ketonkörpern stehen verschiedene Wege zur Verfügung, die je nach Umfeld und Zielsetzung zur Anwendung kommen. Zunächst unterscheidet man die Bestimmung im Urin von der im Blut. Die gängigen Urintests sind semiquantitativ und als Teststreifen erhältlich. Auf der Reaktionsfläche dieser Teststreifen ist Nitroprussid enthalten, das im alkalischen Milieu mit Acetoacetat reagiert und einen lilafarbenen Komplex erzeugt. Gibt man Glycin hinzu reagiert auch Aceton zu diesem Komplex. Dieser Test ist semiquantitativ, da er zwar über die Intensität des Farbtönen Auskunft gibt über leichte, mittlere oder höhere Konzentrationen, aber keine exakte, quantitative Messung zulässt. Die Nitroprussidreaktion spricht nicht auf β -Hydroxybutyrat an(American Diabetes, 1992; Laffel, 1999). Diese Tests finden vor allem in der ambulanten Praxis und als Selbsttest für Patienten Anwendung, ebenso als Screening-Verfahren in der Klinik und auch in der rechtsmedizinischen Routine. Diese Tests zeigen aber auch falsch-positive Reaktionen beim Vorliegen von einigen Medikamenten, wie einige ACE-Hemmer, Mesna, N-Acetylcystein, Penicillamin(Csako and Elin).

Für die Messung von β -Hydroxybutyrat im Blut sind weitere Verfahren entwickelt worden, die im wesentlichen auf enzymatischen Ansätzen beruhen und sich im wesentlichen nur durch die Messmethode unterscheiden. Bei klinischen Fragestellungen erfolgt die Untersuchung i.d.R. im Labor am deproteinisierten Serum. β -Hydroxybutyrat wird durch die entsprechende, zugesetzte Dehydrogenase in Acetoacetat umgewandelt, dabei wird die NADH-Zunahme photometrisch bestimmt durch die Absorption bei 340 nm. Diese Verfahren wurden im Laufe der Zeit weiter verfeinert und auf neue, computergesteuerte Geräte angepasst, um die benötigte Blutmenge und Zeit zu reduzieren. Diese Verfahren sind bei Proben von Leichen oftmals nicht anwendbar, da sie durch die Hämolyse des Blutes beeinflusst werden, wie auch durch freiwerdende Substanzen aus lytischen Zellen wie Malat, Oxalacetat und EDTA bei entsprechenden Probengefäßen(Custer et al., 1983; Harrison et al., 1988). Die Anwendung dieser Verfahren liegt vor allem bei pädiatrischen Fragestellungen, z.B. angeborenen Stoffwechselstörungen, aber auch bei der Differentialdiagnose der Anionenlücke bei metabolischen Azidosen.

Zur Messung von Aceton. Freies Aceton kann generell in Blut, Urin wie auch anderen (Körper)- flüssigkeiten und Geweben mit der Head-Space-Gaschromatographie, auch im Rahmen einer BAK-Bestimmung, problemlos quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Wird zuvor β -Hydroxybutyrat enzymatisch zu Acetoacetat umgesetzt, und thermisch zu CO_2 und Aceton zersetzt, kann letztlich die Gesamtmenge an Ketonkörpern gaschromatographisch ermittelt werden. Nimmt man die Messungen vor, so dass keine weitere Vorbehandlung erfolgt, sollte sich das freie Aceton ergeben. Bei isolierter

Vorbehandlung mittels Erhitzen sollte sich die Summe aus Aceton und Acetoacetat ergeben. Führt man zusätzlich zuvor die enzymatische Umsetzung durch, so ergibt sich die Summe aller 3 beschriebenen Ketonkörper, d.h. incl β -Hydroxybutyrat. Die einzelnen Konzentrationen lassen sich aufgrund molarer Äquivalenz und aus den Differenzen der Messschritte errechnen.

Die Anwendung ist bei klinischen und forensischen Proben beschrieben worden (Felby and Nielsen, 1994; Thomsen et al., 1995). Bei den meisten dieser Verfahren geht etwaiges vorhandenes Aceton in die Messung mit ein, es werden somit alle Ketonkörper erfasst. Sog. freies Aceton, also vor enzymatisch-thermischer Behandlung vorhandenes geht logischerweise auch mit in die Messung mit ein. Der Acetonwert ist somit in der Regel eine Mischung aus freiem Aceton und thermisch erzeugtem. Einzige Ausnahme, zumindest diskutiert, ist die Methode nach Felby, der die Stabilität von Acetoacetat bei 60 Grad Celsius als ausreichend bezeichnet, um nicht mit den Spiegeln des freien Acetons zu interferieren. Führt man sich die chemischen Eigenschaften des Acetoacetats vor Augen, scheint dies zunächst eine zu überprüfende Aussage im Hinblick auf die Reaktionsbedingungen bei üblicher Gaschromatographie.

2.1. Head-Space Gaschromatographie

Das Head-Space-Verfahren der Gaschromatographie (HS-GC) ist ein seit langem eingeführtes und bewährtes Mittel der qualitativen und quantitativen Analyse, in der Rechtsmedizin v.a. bei der forensischen Blutalkoholanalyse. Eine verfeinerte, empfindlichere und trennschärfere Methode kommt zur Bestimmung von Begleitstoffen zur Anwendung. Wie bei der Routineanwendung wird die Probe in ein luftdicht verschließbares Glasröhrchen gegeben, jedoch unter Zugabe von Natriumsulfat zur Dampfdruckerhöhung und damit zur Erhöhung der Empfindlichkeit. Ein zugegebener interner Standard dient dem Integrator als Referenz. Das Röhrchen wird mit einem teflonbeschichteten und damit lösungsmittelfreien Gummideckel luftdicht verschlossen. Die Probe wird dann automatisiert auf 60° C erwärmt. Eine Kanüle sticht ein und nimmt eine Luftprobe über der Probenflüssigkeit. Durch ein konstantes Druckgefälle wird die entnommene gasförmige Probe mittels eines inerten Trägergases, Helium, durch die Trennsäule zum Detektor geführt. Dabei gilt, dass die Konzentration einer flüchtigen Substanz in der gasförmigen Phase der Konzentration in der Flüssigkeit proportional ist (Gesetz von Henry).

Dazu wird ein Temperaturprogramm durchlaufen, das den Anstieg der Temperatur zeitlich kontrolliert, sowie die Zeitdauer, welche eine bestimmte Temperatur gehalten wird. Auch die verschiedenen Abschnitte des Gerätes sind spezifisch temperierbar, um eine optimale

Anpassung an verschiedene zu detektierende Substanzen zu gewährleisten. Nach Injektion durchwandert die Probe eine Säule, wobei die einzelnen Substanzen entsprechend ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften bis zum Austritt am Ende der Säule unterschiedliche Zeit benötigen. Diese Zeit wird als Retentionszeit (RT) bezeichnet. Die Detektion erfolgt qualitativ über die Retentionszeit und quantitativ durch einen Flammenionisationsdetektor. Gemessen wird hierbei der Ionenstrom der proportional zur Menge der Substanz ist.

Zur Ermittlung der einzelnen Kalibratoren und dann der Messwerte werden die Verhältnisse der Peakflächen oder -höhen der flüchtigen Substanzen zum internen Standard, typischerweise in der Natur nicht vorkommendes tertiäres, nicht physiologisches Butanol, ermittelt. Hierdurch werden beispielsweise Pipettierfehler u.a. vermindert. Die jeweiligen Retentionszeiten ermöglichen eine automatisierte Zuordnung und Berechnung der tatsächlichen Konzentrationen über Eichkurven nach Kalibration.

Im Rahmen der Routinemethode werden über unterschiedliche Retentionszeiten folgende flüchtige Substanzen erfasst:

Acetaldehyd, Methanol, Ethanol, **Aceton**, **Propanol-2**, Propanol-1, Methylethylketon, Butanol-2, Isobutanol, Butanol-1, Methylbutanol, Ether und andere Lösungsmittel, Chloroform, Halothan, sowie bei speziellen Fragestellungen Sevofluran und Desfluran als häufig verwendete Narkosegase u.a.. Die Methode lässt sich prinzipiell auch für weitere flüchtige Stoffe anwenden. (Gilg, 1992; Gilg and vMeyer, 1986)

Die genauen Spezifikationen sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2.1

PERKIN-ELMER Capillary Gaschromatograph 8420 Chromato-Integrator D2500 (Merck-Hitachi)		
20 ml Probengefäß	0,25 ml Probe	500mg Na ₂ SO ₄
Untersuchungsmaterial	Serum / Plasma bei Probanden, Serum bei frischen Leichen, sonst Vollblut, zusätzlich Liquor, Glaskörperflüssigkeit, Urin u.a., im Routineverfahren Enteiweißung mit 0,5 ml HClO ₄	
Interner Standard	0,10 ml tertiäres Butanol 0,008%	
Säule	Restek RTX 1701, 60m, 539µm Innendurchmesser, 3µm Filmdicke	
Thermostatisierungszeit	40 Minuten bei 60°C	

Trägergasfluß, Helium	80 kPa, 10 ml/min, 1 min				
Injektion	0,08 min				
Temperaturprogramm	5min isotherm, mit 10°C/min auf 135°C, 0,5min isotherm, 30°C/min auf 200°C, 10 min isotherm				
Kalibration	Wässriger Standard für MeOH, Propanol-1 Serum-Standard für >C ₃ -Moleküle				
Temperaturen	Injektor : 130 °C	Detektor: 200°C	Transfer: 90 °C	Probe: 60 °C	Nadel: 90 °C

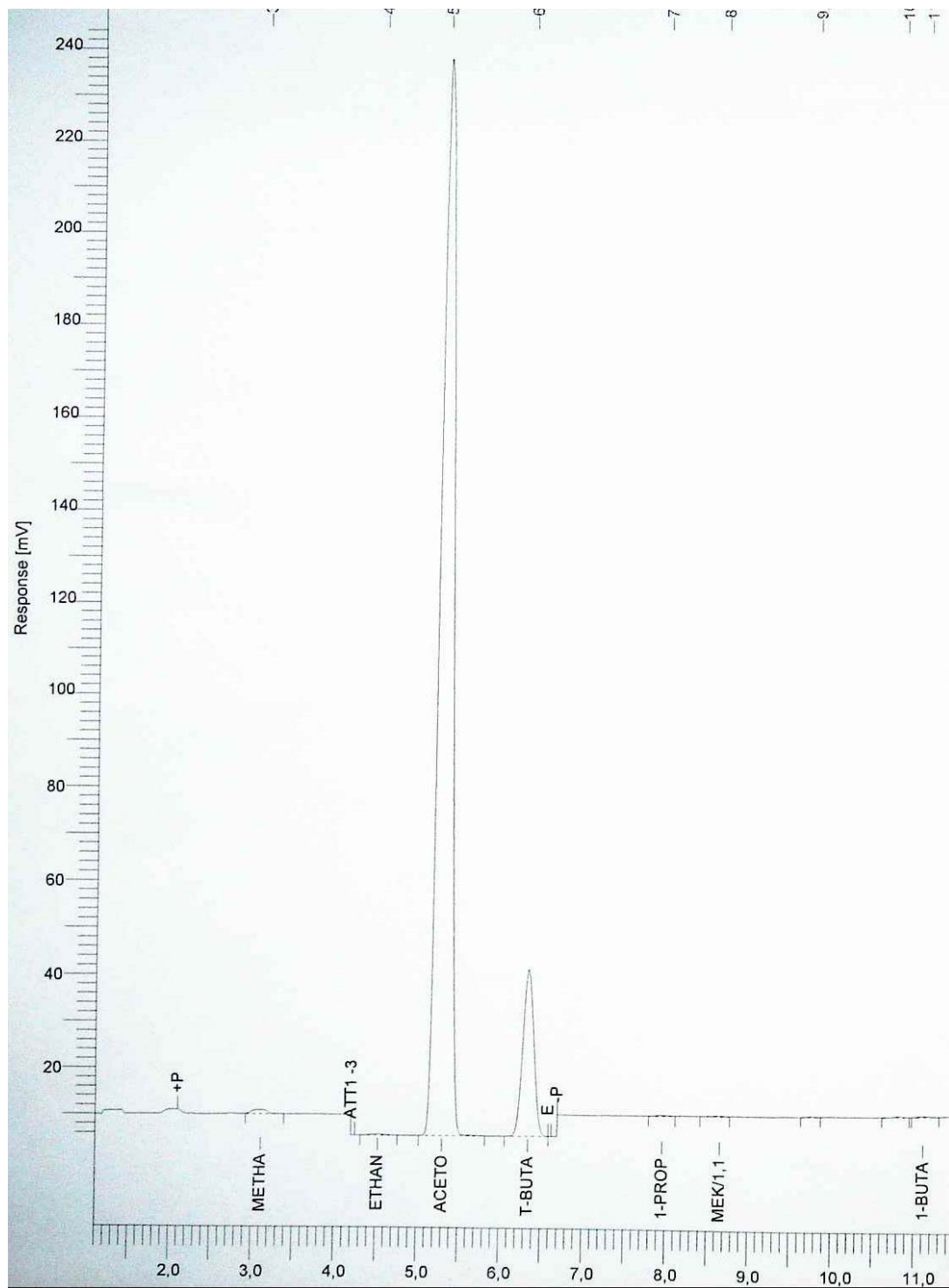


Abbildung 2-1 Head-Space Gaschromatogramm (T-Buta= interner Standard, Aceto= Aceton)

2.1.1. Materialien

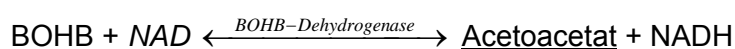
Zur Anwendung kamen folgende Enzyme und Substrate:

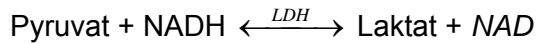
- NAD (Boehringer, free acid, Grade II, 98% dry weight, Cat.- No. 127 981)
- Pyruvat (Boehringer, Monosodium salt, 98% ,Cat.- No. 128 147)
- β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Boehringer, from Rhodobacter sphaeroides, grade II, 3U/mg at 25 °C, suspension in 3.2 M ammonium sulfate solution , Cat.- No. 127 191)
- Laktat-Dehydrogenase (Boehringer, from rabbit muscle, 550 U/mg at 25°C, suspension in 3.2 M ammonium sulfate, Cat.- No. 107 230)
- Phosphat-Pufferlösungen mit pH 7,4 ; 8,5 und 9,0.
- Na- β -Hydroxybutyrate and Li-Acetoacetate (Salt, Sigma chemicals)
- β -Hydroxybutyrat-Calibrator Solution 50mg/dl, Sigma-Chemicals
- Natriumsulfat p. A. zur Erhöhung des Dampfdruckes in der HS-GC
Durch diese Zugabe resultieren deutliche Peakerhöhungen mit entsprechend erhöhter Empfindlichkeit des Verfahrens.
- Perchlorsäure zur Enteiweißung im Routineverfahren des Institutes
Diese dient zur Vermeidung von sogenannten Matrixeffekten, sprich Bindung von Stoffen an bestimmte Eiweißbestandteile.

2.1.2. Theorie der HS-GC

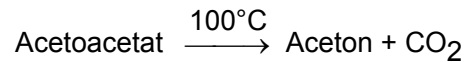
Die empfindliche und spezifische Messung von Aceton per HS-GC ist eine etablierte Methode, während die analytische Erfassung und Trennung von BOHB und Acetoacetat schwieriger ist. Die Idee zur Entwicklung einer differentiellen Methode beruht auf der enzymatischen Koppelung zweier Reaktionen und der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf eine Seite. Zunächst wird β -Hydroxybutyrat mittels der β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase zu Acetoacetat und NADH metabolisiert, durch die gleichzeitige Umwandlung von NADH zu NAD durch LDH und in Überschuss vorhandenem Pyruvat erfolgt eine komplette Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf die Seite des Acetoacetates.

Die gekoppelten Reaktionen lassen sich folgendermaßen darstellen:





Auf die enzymatische Umsetzung kann dann die thermische Umsetzung des Acetoacetates zu Aceton erfolgen.



Nach diesen Schritten erfolgt die Messung der Acetonkonzentration mittels Head-Space-Gaschromatographie (HS-GC). Es ergibt sich je nach Vorgehensweise theoretisch folgende 3 Analysenschritte zur Differenzierung:

1. Freies Aceton: Bestimmung ohne vorangestellte enzymatische und thermische Umwandlungsschritte. Keine Umsetzung von BOHB, aber abzugrenzender Anteil von Acetoacetat, der möglicherweise durch die Temperaturen im Gaschromatographen zu Aceton umgewandelt wird.
2. Acetoacetat (AcAc): Nur thermischer Schritt, es ergibt sich der Summenwert aus freiem, d.h. ursprünglich vorhandenem Aceton und umgesetztem Acetoacetat. Aus der Differenz zu (1.) lässt sich der Acetoacetat-Anteil errechnen.
3. β -Hydroxybutyrat (BOHB): Enzymatische und thermische Umsetzung ergibt die Summe aller in der Probe vorhandenen Ketonkörper. Durch Differenzbildung zu (2.) ergibt sich die Konzentration an BOHB, die ursprünglich in der Probe vorhanden war.

Inwieweit sich durch diese Methode die einzelnen Ketonkörper genau bestimmen lassen ist ein Ziel dieser Arbeit. Es ergibt sich aus theoretischen, physikalischen und biochemischen Überlegungen, dass die thermische Instabilität von Acetoacetat hier ein Problem darstellen könnte. Weiterhin ist es denkbar, dass auch BOHB im Verfahren instabil ist und u.U. zu AcAc und dann Aceton zerfällt. Dadurch würde es zunächst verhindert oder zumindest eingeschränkt, durch weitere Schritte und folgende Differenzbildung für jeden einzelnen Ketonkörper quantitative Aussagen treffen zu können.

2.1.3. Praxis der HS-GC-Methode (Genauigkeit/ Kontrolle/Fehler)

Es erfolgten zunächst Versuche bzw. Vorversuche mit wässrigen Lösungen der zu untersuchenden Substanzen. Die Methode sollte zunächst überprüft und vor allem auf Praktikabilität, dann auch auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit getestet werden. Hierbei ergaben sich mehrere zusätzlich zu betrachtende Punkte. Im Einzelnen waren dies:

1. Der Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität
2. Abweichungen nach den verschiedenen Bearbeitungsschritten (Handlingprobleme)
3. Temperaturabhängigkeit der Prozessschritte
4. Haltbarkeit der eingesetzten Substrate
5. Eichbarkeit/ Präzision

Daraus ergaben sich verschiedene Kontrollversuchsreihen, um die jeweiligen beeinflussenden Faktoren genauer in die Untersuchungsmethode einbeziehen zu können.

2.2. Bedside-Test für β -Hydroxybutyrat

(Abott, Precision Xtra)

Im Dezember 1999 wurde von der Firma Abott ein elektronisches Handgerät (Precision Xtra®) für den Patientengebrauch vorgestellt, mit dem es nach Herstellerangaben möglich ist mit 2 verschiedenen Teststreifen, neben Blutglucosemessungen, auch β -Hydroxybutyrat-Messungen an Kapillarblut durch den Patienten selbst durchzuführen. Die Funktionsweise ist hierbei den heute gebräuchlichen Messgeräten für die Selbstüberwachung des Blutzuckerspiegels bei Diabetikern vergleichbar. Dabei sei neben kapillarem Blut auch venöses Blut messbar. Das Blut wird auf einem Teststreifen aufgetragen, über einen Filter werden korpuskuläre Bestandteile festgehalten, so dass dann am separierten Plasma die Messung vorgenommen werden kann. Die Blutgewinnung beim Patienten erfolgt an der hyperämisierten Fingerspitze oder dem Ohrläppchen durch eine Lanzette. Sie stellt definitionsgemäß eine kapillare Vollblutprobe dar. Auf dem Streifen erfolgt nun mittels β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase die Umsetzung des vorhandenen Substrates, durch den Verbrauch von NAD entsteht ein Elektronenfluß, der im Gerät gemessen wird. Dieser ist hierbei der umgesetzten Menge an β -Hydroxybutyrat proportional und erlaubt die Berechnung und Ausgabe der Konzentration auf dem Gerät (Laboratories, 2000). Der Messbereich umfasst nach Herstellerangaben 0,0 bis 6,0 mmol/l. Die Standardabweichung

wird von 0,11 mmol/l für die unteren Messbereiche (bis ca. 2 mmol/l) und 0,20 mmol/l für die oberen Messbereiche (bei 3,94 mmol/l) angegeben. Die Korrelation zur optisch-enzymatischen Labormethode wird mit $R=0,96$ angegeben.

Ähnliches gilt für die Glucose-Messung mit dem Gerät, wobei die Werte nach unten hin nur bis 20 mg/dl, nach oben hin nur bis 500mg/dl messbar sind. Beim oberen Grenzwert kommt es zu einer Substraterschöpfung auf dem Messstreifen, beim unteren wird die Messungenaugigkeit zu groß, wobei ohnehin eine klinische Relevanz nicht gegeben ist.

Auch die verglichenen Labormethoden beruhen auf NAD-gekoppelten Tests, die in der Regel auf photometrischen Messverfahren beruhen. Demgegenüber sind Messungen an forensischen Probenmaterialien häufig auf die oben beschriebene HS-GC Methode beschränkt, da sich Hämolyse und Fäulnis negativ auf die Durchführbarkeit photometrischer Messverfahren auswirken. Bei der Anwendung des Teststreifens ergaben sich bei überwiegend geronnenem Blut der Leichen teilweise auch Störungen, da offensichtlich nicht genügend messbare Flüssigkeit im System zur Verfügung steht. Hier ergäbe sich auch die Frage, ob eine postmortale Konzentration durch Flüssigkeitsverluste und -verschiebungen stattfindet, die das Messergebnis beeinflussen könnte.

Wesentlicher Vorteil des Gerätes ist die augenscheinlich einfache Handhabung und die schnelle Verfügbarkeit eines quantitativen Testergebnisses. Zur Differentialdiagnose im forensischen Routinebetrieb scheint sich dieser Test insofern zu eignen, als er als Entscheidungsgrundlage für die Notwendigkeit weiterer, präziserer Messungen dienen kann. Da für die Diagnose einer relevanten Ketoazidose eben nicht nur die semiquantitative Erfassung ausreicht, sondern in der Regel erst ab Werten von größer 2,5 mmol/l (Iten and Meier, 2000) eine Ketoazidose als Todesursache diskutiert werden sollte, stellt sich die Frage unter welchen Kriterien (Algorithmus ?) ein derartiges Testergebnis interpretiert und ob weitere Untersuchungen veranlasst werden sollten.

2.3. Die untersuchten Substanzen im verwendeten HS-GC Verfahren

2.3.1. Aceton

Aceton (Ac) ist der kleinste Ketonkörper mit einer mittleren molaren Masse von 58,08 Gramm. In Reinform ist es bei Raumtemperatur eine wasserklare Flüssigkeit von hochtypischem Geruch. Als flüchtige Substanz läßt es sich in der HS-GC nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die gemessenen Konzentrationen nicht dem ursprünglich in der nativen Probe vorhandenen Aceton entsprechen müssen. Eventuell vorhandenes Acetoacetat kann sich thermisch in Kohlendioxid und Aceton spalten und die eigentliche Konzentration an freiem Aceton verfälschen. Die thermische Zersetzung von Acetoacetat wird allerdings von zwei Faktoren beeinflusst: Zum einen von der Temperatur, zum anderen vom pH-Wert. Der Einfluß der Temperatur ist von Felby (Felby and Nielsen, 1994) derart beschrieben, dass es erst ab höheren Temperaturen, d.h. 60 °C deutlich und erst im Bereich des Siedepunktes zu einer wesentlichen Thermolyse käme. Dies bedarf jedoch einer Überprüfung, da es möglich erscheint, dass schon wesentlich früher hier relevante Veränderungen auftreten. Der Einfluß des pH-Wertes bei Messungen von Ketonkörpern ist in der Literatur -soweit bekannt - nicht im Zusammenhang mit GC Messungen beschrieben worden.

2.3.2. Acetoacetat

Acetoacetat (AcAc) hat ein mittleres Massengewicht von 101 Gramm. Das verwendete Natrium-Salz zur Herstellung der Standardlösungen hat ein Massengewicht von 108 g/mol. Die Substanz gilt als thermisch instabil, vom Hersteller wird eine Aufbewahrung des Salzes bei -18°C empfohlen, um die Zersetzung in Kohlendioxid und Aceton zu vermeiden. Zersetzung tritt spontan bereits bei niedrigen Temperaturen auf und erscheint geeignet Messungen wesentlich zu beeinflussen. Acetoacetat ist ein -bei "chemischer" Betrachtung- „echter“ Ketonkörper, es verfügt über zwei nicht endständige Carbonylgruppen.

Für die Kontrolle der Methode wurde eine Eichlösung hergestellt und entsprechend verdünnt um den Messbereich abzudecken, den man nach physiologischen und pathologischen Kriterien erwarten konnte. Hierbei gilt es für Konzentrationsberechnungen zu berücksichtigen, dass das Lithium-Salz von Acetoacetat zur Einwaage verwendet wird. Entsprechend muss das Massengewicht von Lithium mit 7 g/mol berücksichtigt werden. Für die Umrechnung in die jeweils entsprechende Acetonkonzentration ergibt sich also ein Faktor von 0,58. Dieser ist, da aus einem molaren Verhältnis errechnet, dimensionslos. Wie oben schon beschrieben gilt Acetoacetat als thermisch instabile Substanz. Im menschlichen Körper findet, neben der Utilisation als Energielieferant, eine spontane und enzymatische Decarboxylierung zu Aceton statt, welches abgeatmet oder mit dem Urin ausgeschieden wird. In vitro hat Felby beschrieben, dass die Erhitzung einer Lösung auf

100 °C ab einer Dauer von 30 min eine praktisch quantitative Umsetzung des enthaltenen Acetoacetats in Aceton bewirkt. Da hier ja die differenzierte Messung der Ketonkörper im Mittelpunkt stehen soll, ist dies offensichtlich für die Head-Space-Gaschromatographie das vordringliche Problem, für das sich zunächst kein Lösungsansatz bietet. Dies begründet sich dadurch, dass im Gaschromatographen nicht nur die Probe selbst auf 60° C erwärmt wird, sondern Injektor und Detektor eine Temperatur von 130 bzw. 200 °C, die Transferleitung und die Nadel eine Temperatur von je 90°C aufweisen. An diesen Stellen ist also zu erwarten, dass AcAc umgewandelt wird und dann als freies Aceton in die Messung mit geht. Selbst wenn dies nur zu einem Bruchteil der Fall ist, verbleibt die Frage, wie hoch dieser Anteil ist.

2.3.3. β -Hydroxybutyrat

β -Hydroxybutyrat (BOHB) ist der „größte“ Ketonkörper mit einer molaren Masse von 103,1 g/mol. Das im Handel erhältliche Salz ist hochhygroskopisch, wodurch Messungen bei selbst hergestellten Lösungen mit einer erheblichen Fehlerrate im Sinne eines systematischen Fehlers behaftet sind. Dies war der Literatur nur andeutungsweise zu entnehmen, ergab sich aber bei den durchgeführten Vorversuchen.

Alternativ werden von der Industrie Eichlösungen angeboten, die vor allem zur Korrektur von photometrischen, automatisierten Enzymtests gedacht sind.

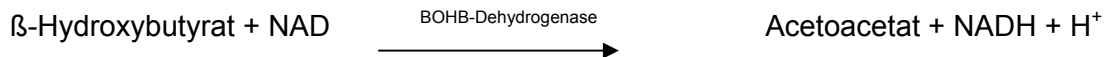
β -Hydroxybutyrat wird im menschlichen Organismus aus Acetoacetat durch die D-3 Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen synthetisiert. Hierbei spielt das Redoxpotential bzgl. NADH/NAD⁺ eine wesentliche Rolle. Je mehr NADH zur Verfügung steht, desto mehr verschiebt sich das Gleichgewicht auf die BOHB-Seite. Über die obligatorische Zwischenstufe Acetoacetat erfolgt auch der Abbau von β -Hydroxybutyrat. Zurzeit ist in der Literatur kein alternativer Abbauweg beschrieben, der es dem menschlichen Körper ermöglichen würde β -Hydroxybutyrat in die Energiegewinnung miteinzubeziehen. Bei hohen Konzentrationen kommt es zur renalen Ausscheidung via glomeruläre Filtration.

Von besonderer Bedeutung ist, dass β -Hydroxybutyrat bei Lagerung eine hohe Stabilität aufweist (Custer et al., 1983), (Fritzsche et al., 2001).

Es kommt bei gekühlten Blutproben kaum zum Abbau, insbesondere bei Serumproben ist der lagerungsbedingte Verlust bei 4°C vernachlässigbar. Dies gilt umso mehr, wenn man die Verluste in Relation zu den Konzentrationen setzt, die als pathologisch angesehen werden. Die forensisch relevanten Konzentrationen von 1,0 bis 2,5 mmol/l, die in der Literatur diskutiert werden um z.B. die alkoholische Ketoazidose mit hinreichender Sicherheit

diagnostizieren zu können, liegen nochmals deutlich über diesen Werten. (Brinkmann et al., 1998; Iten and Meier, 2000; Pounder et al., 1998; Thomsen et al., 1995, , 2000)

In der klinischen Praxis, besonders in der Pädiatrie, erfolgt die quantitative Bestimmung von β -Hydroxybutyrat in einer deproteinisierten Serumprobe mittels Umsetzung in Acetoacetat durch β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase:

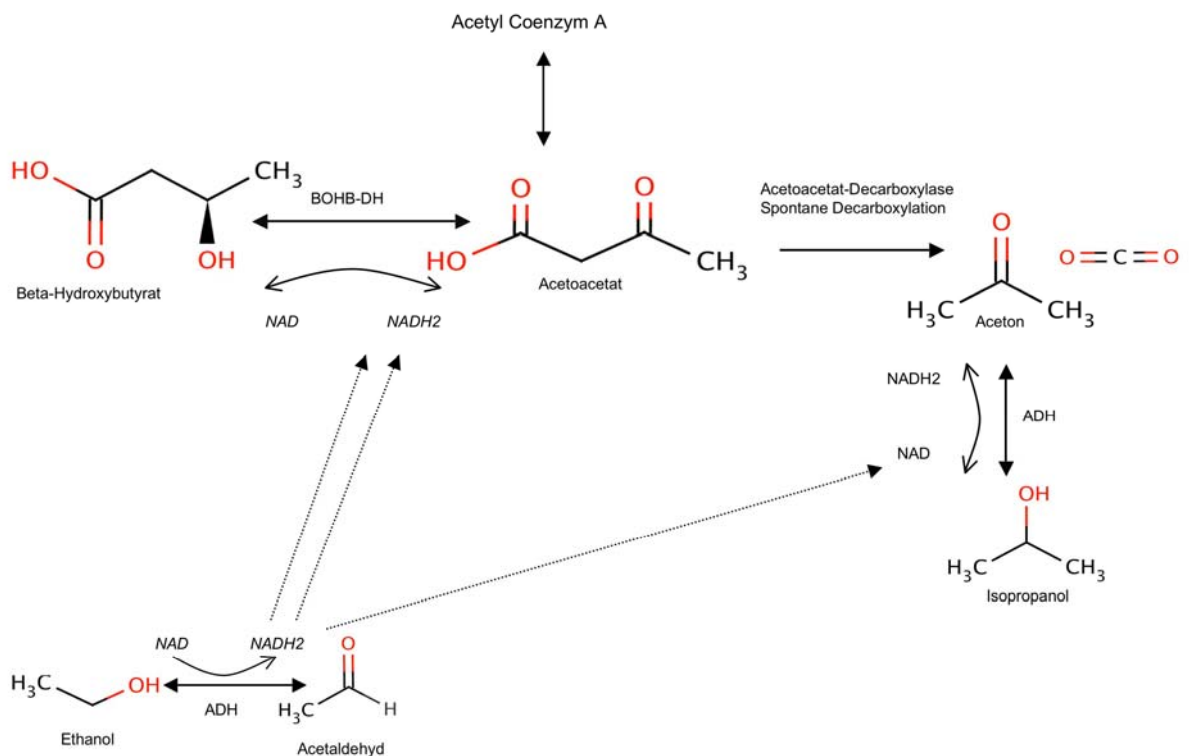


Entfernt man das Acetoacetat durch z.B. Hydrazin aus dem Reaktionsgleichgewicht so wird β -Hydroxybutyrat vollständig umgesetzt. Gemessen wird die Zunahme von NADH_2 im optischen Test. (Thomas and Thomas, 1998)

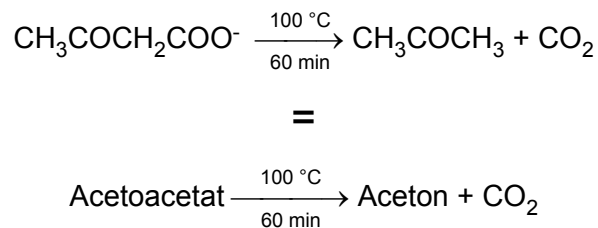
2.3.4. Molare Umrechnung

AcAc zu BOHB	101 [g/mol] /103,1 [g/mol]	1,02
Ac zu AcAc	58,08 [g/mol] /101 [g/mol]	0,58
Ac zu BOHB	58,08[g/mol] /103,1[g/mol]	0,56

Die jeweiligen molaren Massen der untersuchten Substanzen lassen sich zueinander in Beziehung setzen, dadurch errechnen sich die jeweiligen Umrechnungsfaktoren. Der Denkansatz ist hierbei, dass die nachweisbare Stoffkonzentration von Aceton, sprich Teilchenmenge pro Volumeneinheit, nach jeder Umsetzung gleich bleiben muss. Dies ergibt sich auch aus den chemischen Reaktionsgleichungen. Diese sind unten im Zusammenhang nochmals dargestellt:



Durch die Kopplung des Prozesses BOHB zu AcAc mit NAD erzeugender LDH lässt sich das Gleichgewicht auf die Seite des Acetoacetats verschieben. In vitro wird die Umsetzung von AcAc zu Ac dann durch entsprechende Temperaturen erreicht.



2.3.5. β -Hydroxybutyrat-Messung

Um die Genauigkeit des Messverfahrens dennoch erfassen zu können, wurde eine Eichlösung der Firma Sigma verwendet (β -HBA (=BOHB) Calibrator Solution 50 mg/dl; 4.8 mmol/l). Diese wurde entsprechend mit Aqua dest. für Injektionszwecke verdünnt, um den physiologischen und pathologischen Bereich der Stoffkonzentration im menschlichen

Organismus abzudecken. Sinnvoll erschienen dabei folgende Schritte, wobei gleichzeitig die nach obigen Reaktionsgleichungen entsprechenden Mengen an Aceton aufgeführt sind.

Eichkonzentrationen BOHB und Acetonäquivalent			
Mmol/l	mg/l	mmol/l Aceton	mg/l Aceton
0,24	25	0,24	11,5
0,48	50	0,48	23
2,4	250	2,4	115
4,8	500	4,8	230

Diese Ausgangslösungen wurden nun in verschiedenen Ansätzen enzymatisch umgesetzt. Zunächst wurde davon ausgegangen, das von Felby (Felby and Nielsen, 1994) beschriebene Verfahren (s.u.) einfach übernehmen zu können. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die biochemischen Parameter noch verbessert werden konnten bzw. mussten. Ein optimales Messergebnis würde also molar umgerechnet ein Recovery von 100 % der Ausgangskonzentration von β -Hydroxybutyrat liefern.

Die Versuchsbedingungen bzw. Verfahren von Felby sind in folgender Tabelle aufgelistet. Dabei bedeutet Probe jeweils die zu untersuchende Flüssigkeit, die Pipettierschema sind nach den zu bestimmenden Substanzen benannt.

Aceton	
Probe	0,5 ml
NaCl	0,5 g
20 ml vial, PTFE-Stopfen	
HS-GC	
Acetoacetat	
Probe	0,5 ml
NaCl	0,5 g
20 ml vial, PTFE-Stopfen	
100°C (60 min) Decarboxylation	
HS-GC	
BOHB	
Probe	0,5 ml
0,2 mol phosphate buffer pH 8,5	
50 µl 0,4 mol Pyruvate	
50 µl 30 mmol NAD	
10 µl BOHB-Dehydrogenase	
10 µl LDH	
37°C (30 min) Enzymschritt	(Acetoacetat)
100° C (60 min) Decarboxylation	
HS-GC	

Ausgehend von diesen vorgegebenen Arbeitsschritten wurden gezielt Zeitdauer der einzelnen Schritte, pH –Wert und zum Teil technische Schritte des Umgangs mit den Proben variiert, um möglichst optimale Versuchsbedingungen zu finden.

2.3.6. Procedere

Das vorgegebene Arbeitsschema für die Bearbeitung der Proben wurde für die enzymatischen und thermischen Prozesse modifiziert.

Das Routineschema für Begleitstoffuntersuchungen im Institut für Rechtsmedizin umfasst folgendes Pipettierschema:

Routine BGL	
0,25 ml	Probe (i.d.R. Serum oder Plasma)
0,5 g	NaSO ₄ (Dampfdruckerhöhung)

0,5 ml	HClO ₄ (Deproteinisierung)
0,1 ml	Tertiäres Butanol (interner Standard)

Dieses Probengefäß wird anschließend mit einem PTFE-beschichteten Gummistopfen mittels eines durch eine Spezialzange aufzubringenden Aluminiumpressringes verschlossen. Dann folgt die Beschickung des sogenannten „Autosamplers“ für die automatisierte Probenzuführung des Gaschromatographen. Die weiteren Schritte erfolgen automatisiert. Das Schema wurde nun entsprechend modifiziert, um die Umsetzungsschritte für die beiden gaschromatographisch nicht direkt messbaren Ketonkörper implementieren zu können. Behandlungsschema für Acetoacetaterfassung (in den Tabellen als „Methode Acetoacetat“ bezeichnet):

Zunächst wurden die Proben dreigeteilt, um eine gleichartige Behandlung und möglichst kurze Unterbrechung der Kühlung zu gewährleisten.

Aceton	
Probe	0,25 ml
NaSO ₄	0,5 g
HClO ₄ oder Puffer	0,5 ml
Tertiäres Butanol	0,1 ml
20 ml vial, PTFE-Stopfen	
HS-GC Messung als freies Aceton	
Acetoacetat	
Probe	0,5 ml
NaSO ₄	0,5 g
HClO ₄ oder Puffer	0,5 ml
Tertiäres butanol	0,1 ml
20 ml vial, PTFE-Stopfen	
100°C, (variable Zeit) Decarboxylation	
HS-GC Messung als Aceton, Summe aus freien Aceton und AcAc	
BOHB	
Probe	0,5 ml
0,2 mol phosphate buffer pH 8,0	
50 µl 0,4 mol Pyruvate	
50 µl 30 mmol NAD	
10 µl BOHB-Dehydrogenase	
10 µl LDH	

37°C, 30 min	
100° C (60 min) Decarboxylation	
HS-GC, Messung als freies Aceton, Gesamtsumme aus BOHB, AcAc und freiem Aceton	

Die Acetonanalyse ist, was die verwendeten Substanzen betrifft, identisch mit dem BGL-Routine-Schema. Bzgl. der Analyse von AcAc und β -Hydroxybutyrat ist der Hauptunterschied die Inkubation des verschlossenen Gefäßes bei 100°C für eine Stunde. Dies führt zu einer thermischen Zersetzung des Acetoacetats in Aceton und CO₂. Dabei wird von Felby eine Temperaturabhängigkeit der Umsetzung angegeben (Felby and Nielsen, 1994), insofern als dass bei 100°C innerhalb 60 Minuten eine vollständige Umsetzung in Aceton und Kohlendioxid stattfindet. Die temperaturabhängige Decarboxylation illustriert Abbildung 2-2 nach :

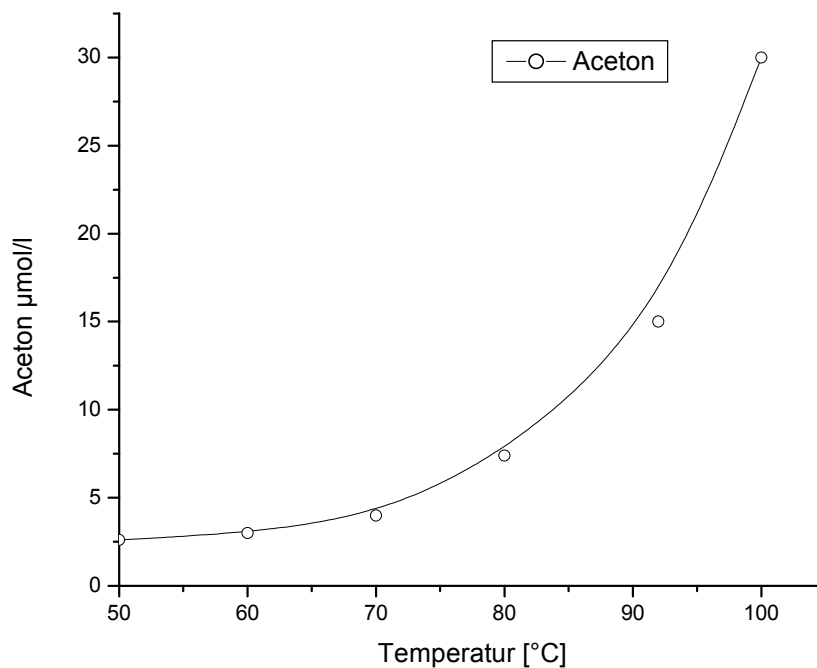


Abbildung 2-2 Temperaturabhängigkeit der Decarboxylation AcAc zu Aceton (nach Felby)

In einem weiteren Versuch (vgl. Abb 2-3) beschreibt Felby die Umsetzung als quantitativ nach einer Temperierungsdauer von einer Stunde, hierbei gibt er eine Grafik an, die einen wesentlich flacheren Verlauf zeigt, was die zeitabhängige Decarboxylation von Acetoacetat betrifft.

Allerdings werden hier nur 3 Messwerte grafisch wiedergegeben, auch ist der Literatur nicht genau zu entnehmen, bei welcher Temperatur eine derartige Umsetzungskinetik resultiert. Es ist anzunehmen, dass es sich um eine Temperatur etwas unter 100 °C handelt.

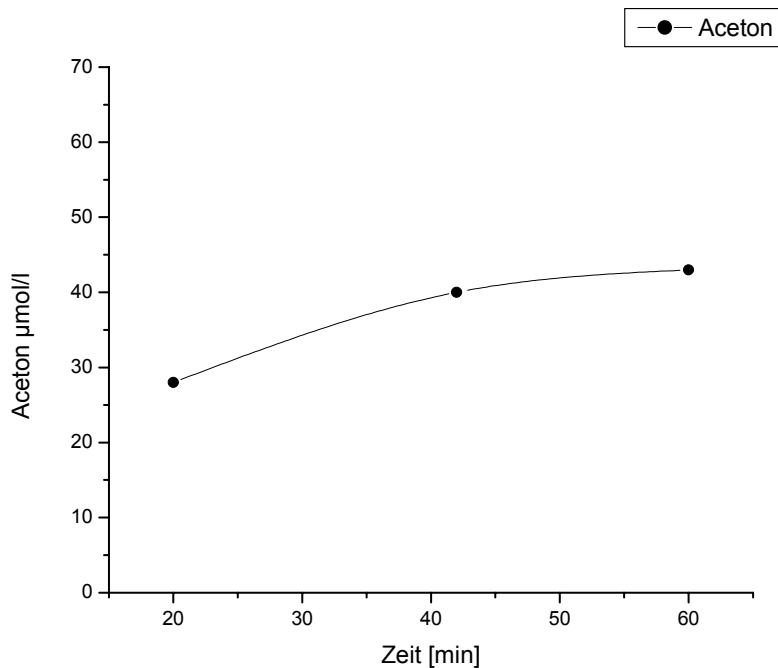


Abbildung 2-3 Zeitabhängige Decarboxylation nach Felby

Im Gegensatz hierzu steht, dass bei fehlender thermischer Vorbehandlung keine relevante Umsetzung des Acetoacetats stattfindet. Da dies bei der analytischen Methode der Gaschromatographie mit entsprechenden Temperaturen auffällig erschien, wurde versucht dies nachzuvollziehen. Entsprechend erfolgten Versuche mit Variation von Zeitdauer der Carboxylation und pH-Wert des eingesetzten Phosphatpuffers.

2.4. Berechnungen

Da das HS-GC Verfahren nur (freies) Aceton direkt quantifiziert, ist eine Umrechnung in die molaren Äquivalente der enzymatisch bzw. thermisch gebildeten Substanzen notwendig. Die

Umrechnungsfaktoren ergeben sich aus den jeweiligen Massengewichten. Da die enzymatische und thermische Umsetzung molar äquivalent ist, d.h. gleiche Stoffmengen ergibt, ist dann keine weitere Umrechnung nötig. Die Berechnung der jew. molaren Konzentration erfolgt über Differenzbildung. Dies erfolgte mittels einer Excel-Tabelle, in der die jeweiligen Umrechnungsfaktoren automatisch berücksichtigt wurden. Aus den gemessenen Werten in mg/l der verschiedenen Ansätze lassen sich mittels folgender Umrechnungsfaktoren die molaren Äquivalente berechnen:

Mittlere Massengewichte: Aceton 58,08, Acetoacetat 101, BOHB 103,1 je g/mol.

Probenrückrechnung Kontrollen (Salzlösungen)/[g/mol]						
						Faktor
	AcAc zu BOHB			108/126,1		0,86
	Ac zu AcAc			58,08/108		0,54
	Ac zu BOHB			58,08/126,1		0,46
Probenrückrechnung Blut, Liquor, etc.						
	Korrigiert durch Abzug der Kationengewichte			zu Aceton	von Aceton	
BOHB	Na MW	23	126,1	103,1	0,56	1,78
AcAc	Li MW	7	108	101	0,58	1,74

Die erhaltenen Aceton-Gaschromatogramme wurden optisch auf eventuelle Fehler überprüft. Fehlmessungen, etwa durch falsche Retentionszeiterfassung oder übermäßig breite Basis der „peaks“, sog. „tailing“, wurden korrigiert oder die entsprechenden Werte ausgeschlossen. In seltenen Einzelfällen wurden die Retentionszeiten manuell zugeordnet und die Konzentration über die Fläche nachberechnet. Die Werte wurden dann in eine Excel-Tabelle übertragen, die entsprechend mit den Umrechnungsfaktoren und Differenzbildungen versehen war. So war nur eine einmalige Eingabe der Aceton-Messwerte notwendig, um die verschiedenen spezifischen Messwerte für die einzelnen Ketonkörper bzw. die Summe derselben zu erhalten. Die berechneten Werte sind in der Tabelle ersichtlich. Dabei sind Summenwerte in mmol/l angegeben, KBR bedeutet „ketone body ratio“ und stellt das Verhältnis von BOHB zu Acetoacetat dar. Über dem Normbereich liegende Werte wurden über sog. bedingte Formatierungen automatisch farbig hervorgehoben.

Beispiel:

Probe 0,25ml	Material	Zusatz 0,5ml	Methode	Ergebnis Aceton [mg/l]	Aceton [mmol/l]	AcAc [mg/l]	AcAc [mmol/l]	BOHB [mg/l]	BOHB [mmol/l]	KBR	BOHB/AC+ACAC	AcAc+β-Hydroxybutyrat [mmol/l]	Σ Ketone [mmol/l]
F1	Serum	pH 8,0 Puffer	Aceton	17,3	0,298								
F1	Serum	Perchlorsäure	AcAc	18,0	0,310	1,2	0,01						
F1	Serum	pH 8,0 Puffer	BOHB	28,0	0,482			17,8	0,17	14,3	14,6	0,185	0,482

3. Ergebnisse

3.1. Diagnostik mittels Head-Space Gaschromatographie

3.1.1. Aceton

Durch die hinreichend großen Erfahrungen, die mit der HS-GC bei sog. Begleitstoff-Untersuchungen bestehen, war die Messung von Aceton problemlos möglich. Es zeigte sich, dass zwar Verunreinigungen eine Rolle spielen, die aber durch entsprechende Leerproben sicher erkannt werden können. Damit ist gegebenenfalls sogar eine Korrektur der Messwerte möglich, indem die Verunreinigungen rechnerisch abgezogen werden. Voraussetzung ist, dass das zur Analytik verwendete Material vor jeder Testreihe mit untersucht wird.

Ein Phosphatpuffer war beispielsweise mit Methanol verunreinigt, was erst in der Routinediagnostik erkannt wurde, da hier gezielt gesucht werden konnte, welcher der einzelnen Schritte zu einem zusätzlichen Peak geführt hatte.

Eine Lagerung der Proben bei 4 °C zeigt nach Jones keine wesentliche Beeinflussung der Acetonkonzentration (Jones et al., 1993). Dies gilt nur für wässrige Lösungen von Aceton oder Blutproben, die kein Acetoacetat enthalten. Die beobachteten Zeiträume reichen bis 3 Monate.

Die Messung von Aceton steht aufgrund der rechnerischen Ableitung der Konzentrationen der anderen Substanzen im Vordergrund.

Die Präzision der Messungen im Begleitstoff-Verfahren wird von Gilg (Gilg, 1992) mit einer Streuung von 5% für wässrige Lösungen sowie 10 % für Serumproben angegeben. Für die vorliegende Arbeit erfolgte ein Vergleich von Messungen, die mehrfach an den gleichen Proben nahezu zeitgleich vorgenommen wurden. Bei Validierung der eigenen Messwerte ergab sich ein Unterschied zwischen wässrigen Lösungen und frischen Blutproben einerseits und älteren Blutproben und thermisch-enzymatisch behandelten Proben andererseits. Die wässrigen Lösungen zeigten einen maximalen relativen Standardfehler von 1,7%, frische Blutproben – von Lebenden- zeigten einen maximalen relativen Standardfehler von 2,6%. Für faule Blutproben, die dann noch ggf. thermisch-enzymatisch behandelt wurden ergab sich ein maximaler, relativer Standardfehler von bis zu 6,8 %. Bei zusammengefaßter Schätzung des Standardfehlers als sog. "pooled estimate" entsprechend geeinter Schätzung ergab sich $s = 7,6 \text{ mg/l}$. Wobei $s = \sqrt{\text{Summe der Quadratfehler/Freiheitsgrade}}$ (Skoog and

Leary). Dies bezieht die Messungen für alle relevanten Ketonkörper mit ihren unterschiedlichen Behandlungen mit ein. Insofern ist von einer hinreichenden Präzision des Messverfahrens auszugehen.

3.1.2. Acetoacetat

Weit im Vordergrund stehende Problematik bei der Acetoacetat-Messung ist dessen thermische Instabilität. Insbesondere die Messung mittels GC legt nahe, dass es aufgrund der Temperaturverläufe während der Messung (siehe Methode) zu Veränderungen kommen kann. Dies spielt keine Rolle, soweit Acetoacetat zur Summenmessung bereits vor der quantitativen Bestimmung zu Aceton thermisch zersetzt wird. Jedoch erscheint es wahrscheinlich, dass bei dem Versuch eine differenzierte Messung zu erreichen, mindestens ein Teil des AcAc intraapparativ zersetzt wird, als AcAc nicht erfasst wird und zu einer falsch-positiven Messung / Erhöhung des Acetons führt. Es müsste also für das sog. Recovery ein Wert von über 100% resultieren, falls dies eintritt.

Durch Messung von möglichst reinen Acetoacetat-Ansätzen in aqua dest unter Variation der Bearbeitungsschritte wurde versucht dieses Problem einzugrenzen. Die außer Acetoacetat verwendeten Flüssigkeiten wurden vorher auf Aceton untersucht, um einen systematischen Fehler auszuschließen

Es wurden verschiedene Parameter variiert, um eine Beeinflussung des errechneten Acetaoacetat-Wertes erfassen zu können (Abbildung 3-1).

- a) Variation der Zugabe von Wasser bzw. Perchlorsäure und anschließend sofort HS-GC oder thermischer Decarboxylation wie im Schema und folgend HS-GC.

Es zeigten sich Wiederfindungsraten (Recovery) des eingesetzten Acetoacetats – gemessen als Aceton - von 5,9; 66,6; 83,1 und 98,7%. Zu beachten ist, dass die erste Probe unmittelbar aus dem Kühlschrank (4°C) entnommen wurde und dann der GC unterzogen wurde. Um diesen Effekt eingrenzen zu können, erfolgte die Untersuchung einer Probe, die zunächst bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Im gleichen Ansatz wurde untersucht, welchen Einfluß die Zugabe von Perchlorsäure auf das Acetoacetat-Recovery hat. Dabei zeigte sich, dass auch bei gekühlter Probe (GC-Röhrchen von 4°C direkt in GC) die Zugabe einer starken Säure wie Perchlorsäure zu einer erheblichen Decarboxylation führt. Hier wurden 66,6 % als Aceton detektiert, d.h.

abzüglich 5,9% sind dann 60,7% auf die Einwirkung der Säure zurückzuführen. Auch die beiden Ansätze, die einer thermischen Behandlung zur Decarboxylation unterzogen wurden, zeigten – unerwarteterweise- deutliche Unterschiede. Trotz der Erhitzung auf 90 °C für 1 Stunde zeigte der „säurefreie“ Ansatz nur 83,1 % des erwarteten Acetonwertes. Der Perchlorsäure-Ansatz mit einstündiger Erwärmung auf 90 °C zeigte hingegen eine praktisch vollständige Umsetzung des enthaltenen Acetoacetates in messbares Aceton.

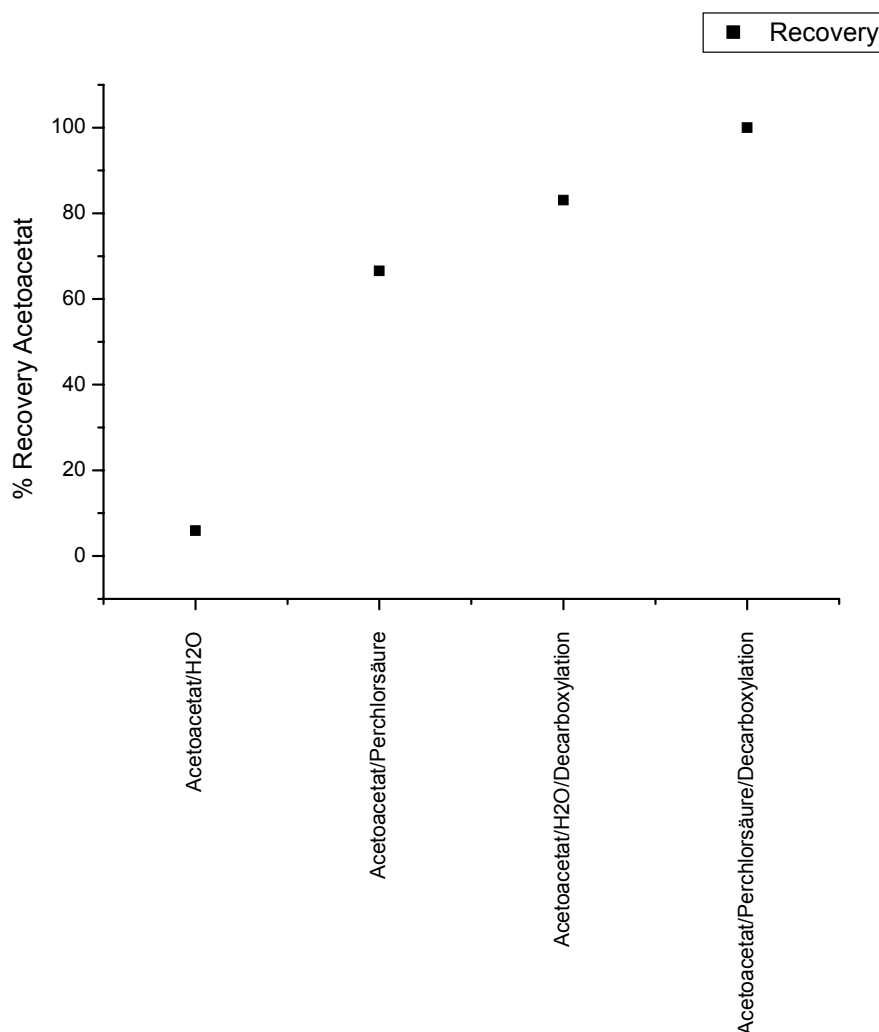


Abbildung 3-1 Aceton aus Acetoacetat abhängig vom Ansatz

b) Die Abhängigkeit von der Zeit bei Lagerung bei Raumtemperatur zeigt Abbildung 3-2 (Ansatz mit aqua dest. statt Perchlorsäure, sonst wie Routine). Hier wurden je 3

Proben untersucht, um weiter eingrenzen zu können, welchen Einfluß Unterschiede im der Handhabung der Proben haben, die sich rein aus der sequentiellen Abarbeitung von „herumstehenden“ Proben ergeben..

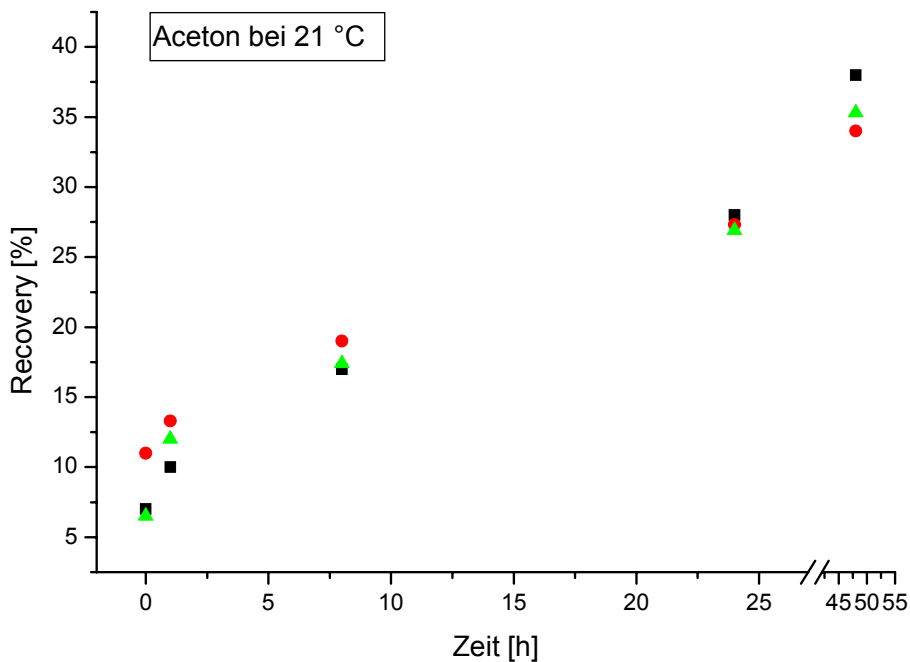


Abbildung 3-2 Acetoacetat Recovery bei 21 °C Lagerung, jeweils 3-fach Messung von Aceton

Hierbei zeigten sich Werte von 8,1%, 11,7%, 17,8%, 27,4% und 35,7 % Recovery im Mittel. Bemerkenswert ist, dass sich trotz ähnlichen Handlings und nur geringen Verzögerungen auch bei rascher Messung teilweise ein Recovery von 11% ergab, was bei anderen Ansätzen als Fehler in die Messung miteinginge.

Ein weiterer interessanter Effekt trat auf, wenn die Proben bei größerer Anzahl länger im Autosampler standen und die experimentellen Proben dementsprechend weiter hinten einsortiert wurden. Bereits hier erfolgt eine Temperierung auf 60 °C, so dass dann Recovery-Werte von bis zu 71% auftraten. Dies wäre nur zu umgehen, wenn Proben ohne Autosampler der HSGC zugeführt werden würden, was bei einer – einigermaßen - ökonomischen Arbeitsweise im Labor praktisch nicht darstellbar ist, da man dann jede Probe einzeln gekühlt zuführen müsste.

Bei Temperierung auf 100°C für 30 Minuten zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen Proben, die mit Perchlorsäure vorbehandelt waren und nur gepufferten Proben. Die

Abweichungen lagen hierbei im Rahmen der Messgenauigkeit des Verfahrens. Fazit ist hier, dass eine Temperierung auf 100°C über 60 min zu einer vollständigen Decarboxylation führt.

3.1.3. β -Hydroxybutyrat

Die Herstellung einer wässrigen Kalibrationslösung von β -Hydroxybutyrat erwies sich als schwierig. Die selbst eingewogene Menge β -Hydroxybutyrat war in den ersten Versuchen um bis zu 190% von den erhaltenen Messwerten abweichend. D.h. die Messung lag weit unter dem Erwartungswert. Eine photometrische Messung im Labor der pädiatrischen Klinik, bestätigte die eigenen Messungen im enzymgekoppelten HS-GC Verfahren.

Die Kontroll-Messung der dann später zur Verfügung stehenden Eichlösung erbrachte dann auch mit der HSGC mit vorangestellter enzymatischer Umwandlung plausible Messergebnisse. Diese waren dann auch hinreichend genau, wenn sich auch größere Schwankungen ergaben, als dies bei der Untersuchung der Reinsubstanzen Aceton und Acetoacetat der Fall war. Hierzu sind später als Grund verschiedene Möglichkeiten zu diskutieren.

Als wahrscheinlichste Erklärung für die zunächst völlig unzufriedenstellenden Messwerte bzw. Unmöglichkeit der Überprüfung des Verfahrens ist die äußerst hohe Hygroskopität des verwendeten Na-Salzes von β -Hydroxybutyrat in Betracht zu ziehen. Diese wird in den Produktinformationen zwar erwähnt, dass sie aber systematische Fehler von 50 % bedingen würde, erschien zunächst abwegig. Die entsprechende Kalibrationslösung von Sigma Chemicals konnte mittels der beschriebenen Methode im HS-GC ebenfalls gemessen werden. Nach Umrechnung der Ergebnisse ergab sich folgendes Bild:

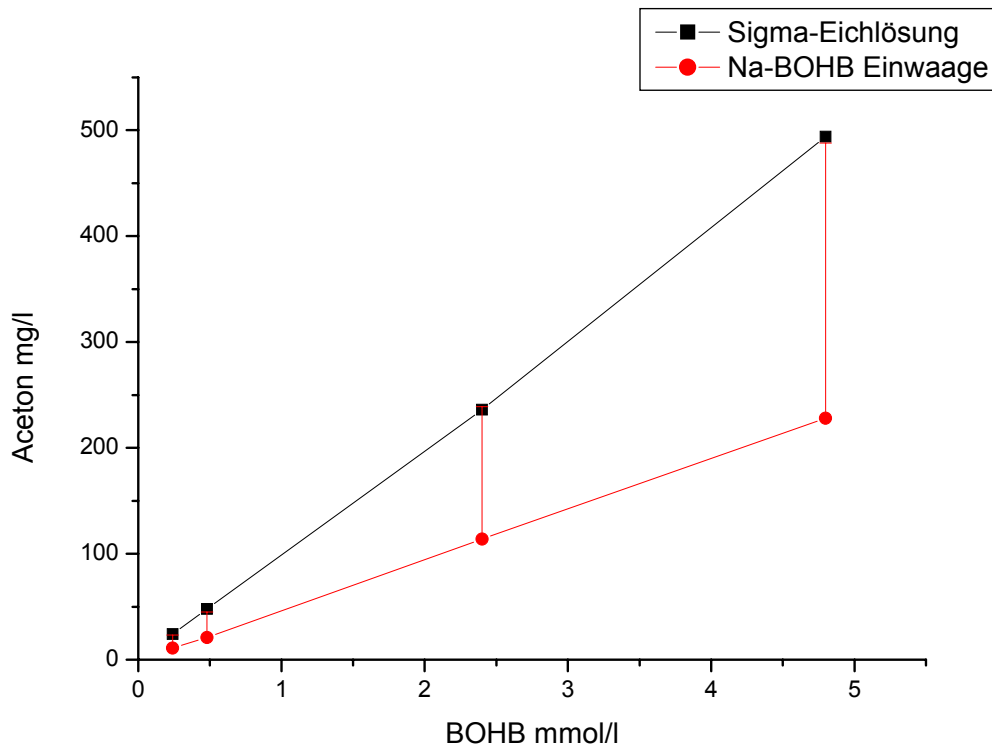


Abbildung 3-3 Messfehler in Abhängigkeit von der eingesetzten BOHB-Konzentration

Der Messfehler erreichte im Mittel 50%, war bei frischerem NA-BOHB deutlich geringer, stieg aber auch nicht über diesen Wert an. Insofern ist davon auszugehen, dass mit jedem Öffnen des Gefäßes eine Sättigung des Salzes mit Wasserdampf erfolgte, bis sich ein gewisses Gleichgewicht eingestellt hatte.

Bis zur Lösung dieses Problem wurden zahlreiche unterschiedliche Ansätze untersucht. Insbesondere wurde zunächst versucht über eine Variation der Inkubationszeiten des enzymatischen Ansatzes, die Inkubationszeit der Thermolyse des Acetoacetats und über verschiedene pH-Werte der verwendeten Puffer mögliche Fehler auszuschließen. Dabei ergaben sich verschiedene Erkenntnisse, was die Parameter der verschiedenen Ansätze angeht.

- pH-Wert: Es wurden die pH-Werte des eingesetzten Puffers unterschiedlich gewählt, 6,0 ; 7,0; 7,5; 8,0. Dabei zeigte sich, dass bei einem pH von 6,0 die enzymatische Reaktion auch bei längerer Inkubationszeit unvollständig ablief. Zwischen 7,0 und 8,5 ergab sich ca. bei 8,0 ein Maximum, allerdings erbrachte bei 7,0 und 8,5 eine längere Inkubationszeit das gleiche Ergebnis bezogen auf die Wiederfindungsrate.

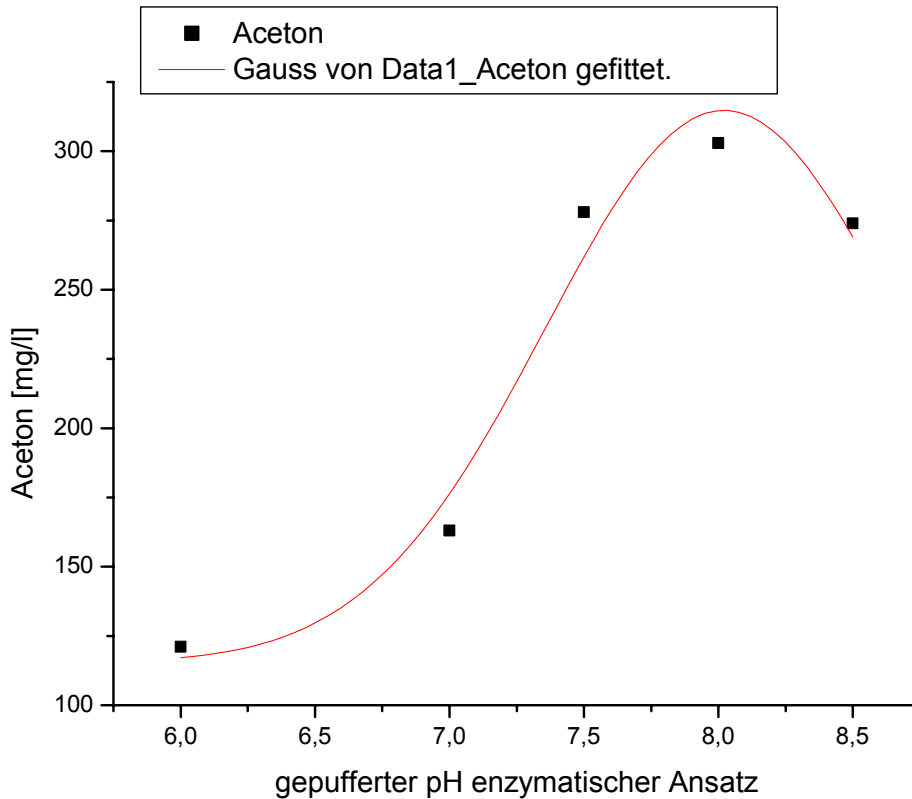


Abbildung 3-4 Inkubationszeit 30 min

-Thermolyse-Zeit: Hier zeigte sich, dass nach 1 Stunde Inkubation bei 100 °C keine wesentliche Änderung der Wiederfindungsrate stattfand.

- Inkubationszeit Enzymansatz: Wie oben bereits erwähnt, zeigte sich nur bei ungünstigem pH-Wert eine Änderung der Wiederfindungsrate, bei pH 7,0 und 8,5 war die Wiederfindungsrate nach 1 h Inkubation auf dem Niveau des optimalen pH-Wertes.

Über diese Ansätze ergaben sich auch Erklärungen zu den Schwankungen, die bei den ersten enzymatischen Ansätzen für die β -Hydroxybutyrat-Messung auftraten.

Es hat sich gezeigt, dass β -Hydroxybutyrat eine als stabil zu bezeichnende Substanz ist. Blutproben, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zum Teil mehrfach untersucht worden sind und dabei bis zu 4 Monate im Kühlschrank bei 4°C lagerten, zeigten nur marginale Veränderungen der Messergebnisse im Bereich von wenigen Prozentpunkten. Bei Versuchen mit wässrigen Lösungen mit einer Ausgangskonzentration von 2,5 mmol/l BOHB zeigte sich folgendes Bild:

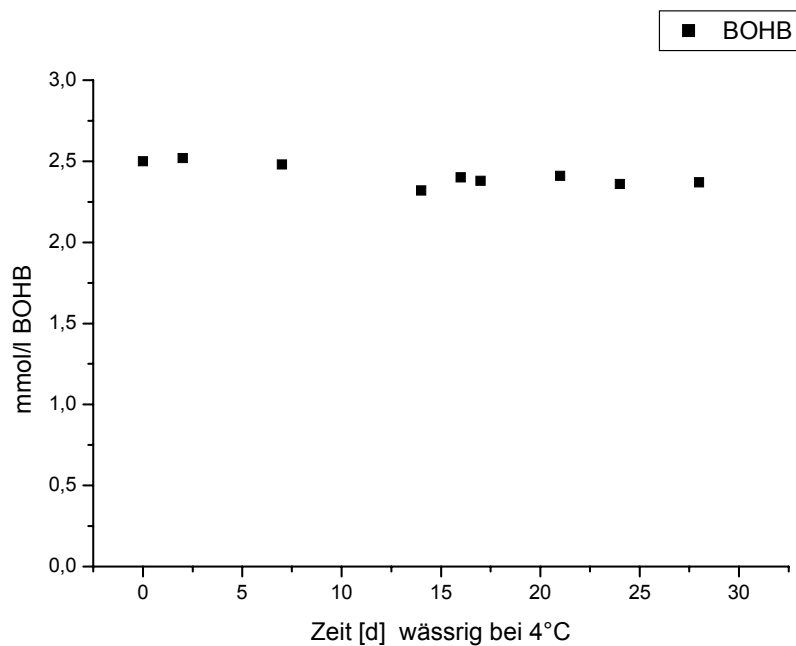


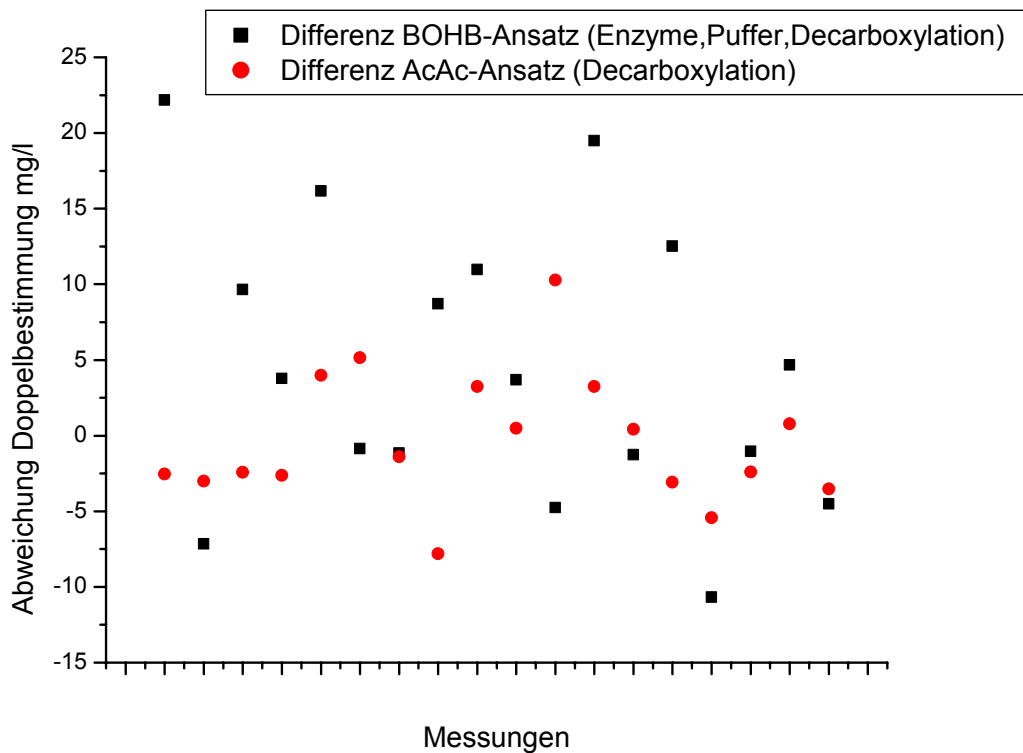
Abbildung 3-5 Lagerung BOHB wässrig

Für Blutproben die im Rahmen von Obduktionen gewonnen wurden ergab sich ein ähnliches Bild. Allerdings ergaben sich größere prozentuale Abweichungen bei niedrigeren Konzentrationen. Mehrfache Messungen von Proben, die über 2 Wochen bei 4° C aufbewahrt wurden, zeigten „Verluste“ von bis zu 7 %, während tiefgefrorene Proben (-18°C) deutlich geringere Lagerungserscheinungen von max. 4 % zeigten.

Insgesamt zeigte sich aber, dass die erhaltenen Acetonmesswerte größeren Schwankungen unterlagen, wenn sie aus der Untersuchung einer Probe stammten, die zuvor mittels enzymatischem Ansatz und thermischer Decarboxylierung „aufbereitet“ wurde. Die BOHB-Methode war also unpräziser, auch das Recovery unterlag größeren Schwankungen, jedoch

deutlich geringer, als dies Felby (Felby and Nielsen, 1994) in seiner Arbeit angibt.

Abbildung 3-6 Differenzen bei Doppelbestimmung, AcAc-Verfahren und BOHB-Verfahren



Die obige Grafik illustriert diese Schwankungen. Hierzu wurden von einem Versuchsansatz die Differenzen zwischen den beiden Acetonwerten errechnet, die sich aus der Doppelbestimmung der Proben ergab. Die Werte zeigten nach dem BOHB-Ansatz deutlich größere Schwankungen (Standardabweichung AcAc-Ansatz 4,3 mg/l, BOHB-Ansatz 9,3

mg/l) bei einem Standardfehler von 1,0 bzw. 2,2 mg/l für diese Stichprobe. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die untersuchten Blutproben generell festgestellt, ist aber u.U. auf Fäulniserscheinungen zurückzuführen, die aufgrund auftretender flüchtiger Substanzen oftmals zu nicht genau abgrenzbaren „Peaks“ im Chromatogramm führten. Eine weitere Quantifizierung erfolgte hier nicht, da dies der Literatur zu entnehmen ist (Gilg, 1986).

3.2. Elektrochemischer Schnelltest, Mehrschichttechnik, „Precision Xtra“

Primäre Fragestellung ist die Funktionalität und Praktikabilität des unter 2.2 beschriebenen Verfahrens. Dabei zeigte sich, daß bei frischeren Leichen eine Messung am Vollblut gut möglich war. Einschränkungen ergaben sich offensichtlich aufgrund der Messmethodik. Bei zu hoher Viskosität des Blutes, wie bei längerer Liegezeit oder insbesondere Fäulnis häufig der Fall, konnte meist kein Messergebnis erzielt werden. Dies trat in der Regel bei Leichenliegezeiten von mehr als 2 Tagen auf. Die alternative Messung im Liquor liefert solange Ergebnisse, wie Liquor zur Verfügung steht. In der Regel ist dies mehrere Tage, bis hin zu einer Woche der Fall. Allerdings ist das Gerät nicht für diese Messung ausgelegt. Bei theoretischer Betrachtung ergeben sich allerdings zunächst keine Aspekte, warum eine Messung am Liquor falsche Messwerte liefern sollte.

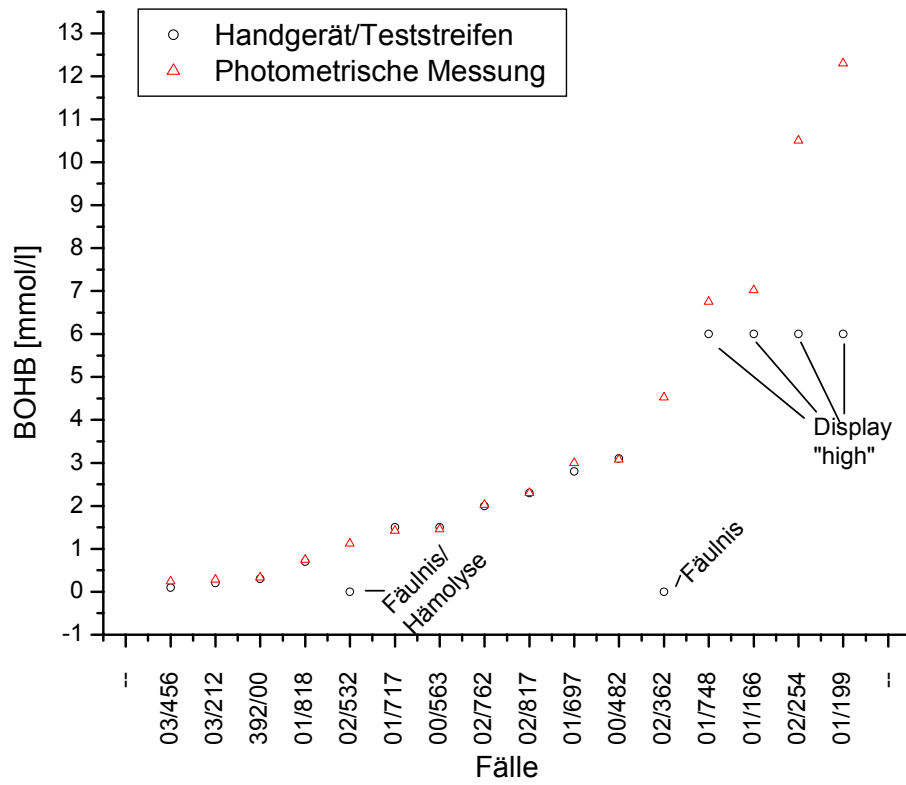


Abbildung 3-7 Exemplarische BOHB-Messungen mit „Precision Xtra“

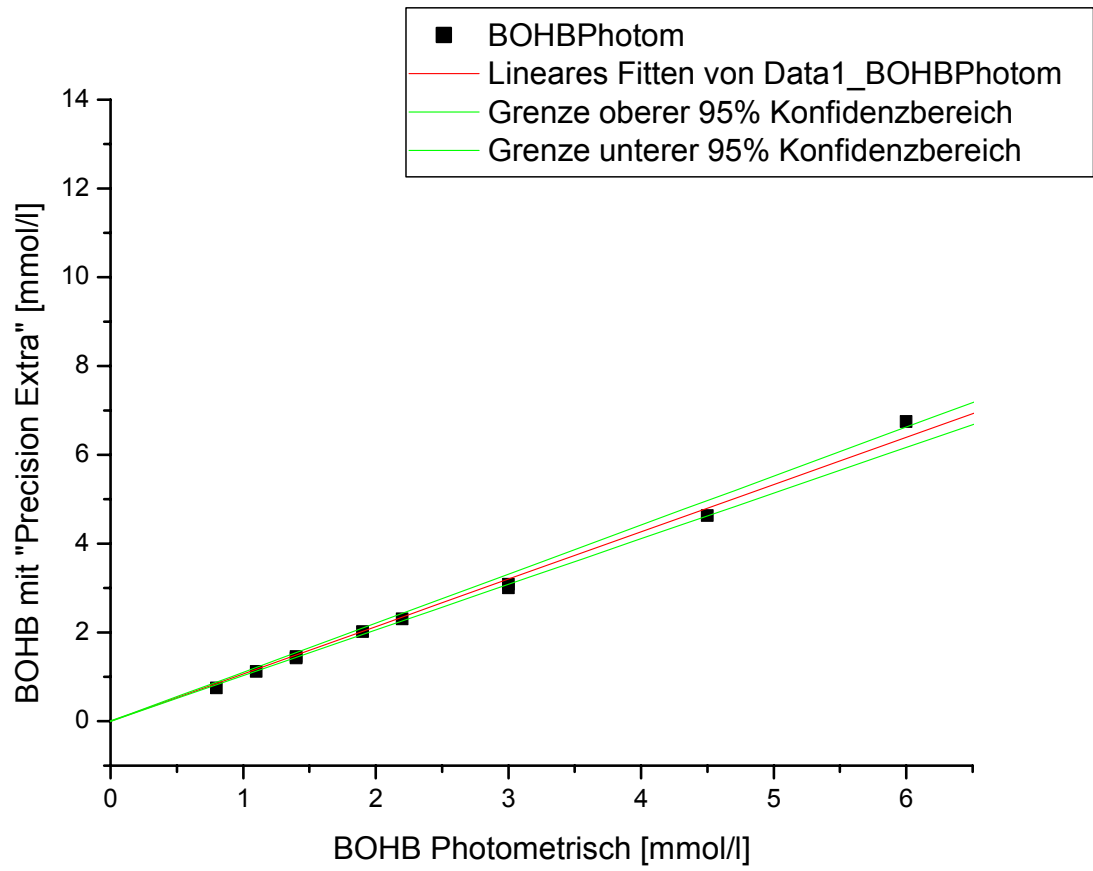


Abbildung 3-8 Regression

Lineare Regression durch den Ursprung für Data1_BOHBPhotom:

$$Y = B * X$$

Parameter	Wert	Fehler		
B	1,06616	0,01695		
R	Standardabweichung	N	P	
0,99746	0,15944	10	<0.0001	

Tabelle 3.1 Lineare Regression Streifentest vs. Laborverfahren

Bei vergleichender Messung mit dem photometrischen Verfahren ergab sich bei frischen Proben eine sehr gute Korrelation zwischen Handgerät und Laborverfahren (Abbildung 3-7,Abbildung 3-8,Tabelle 3.1 Lineare Regression Streifentest vs. Laborverfahren

Beim Vergleich mit dem enzymatisch-gaschromatographischen Verfahren ergab sich v.a. bei einigen Proben, die aufgrund ihres Alters hämolytisch verändert waren z.T. Differenzen, aber keine Abweichungen die die Diagnosesicherheit bezüglich deutlich erhöhter Ketonkörperwerte in Frage stellen würde. Dennoch ergibt sich für fäulnisverändertes Blut oder auch Blutproben mit hoher Viskosität, dass hier teilweise bereits nach 2 Tagen Liegezeit (in der Regel bei Zimmertemperatur) oder teilweise nach 4 Tagen Liegezeit (Kühlung) kein Messergebnis mit dem Handgerät mehr zu erzielen war. Es erfolgte die Anzeige „Error“ oder das Gerät startete die Messung nicht und meldete anhaltend „Blut auftragen“. Am ehesten dürfte das darauf zurückzuführen sein, dass der Teststreifen einen eingebauten „Filter“ aufweist, der bei hochviskösem Blut oder zu vielen Partikeln – etwa Zelltrümmer, lytische Erythrozyten, nicht mehr genügend Plasma bzw. Serum zum Enzymträger, dem eigentlichen Reaktionsort durchlässt. Orientierend wurde daher, nach ersten Erfahrungen dieser Art, versucht Messungen mit dem Handgerät an Liquor vorzunehmen. Dies lieferte in aller Regel Messwerte, solange der Liquor ohne wesentliche Verunreinigung asservierbar war. Inwiefern dieser Messwert dann vergleichbar ist, bzw. wie zu interpretieren wäre eine separate Fragestellung. Zumindest stützt die erfolgreiche Messung an „klarer“ Flüssigkeit, bei sonst gleichen Bedingungen, die These, dass es bei fäulnisveränderten Blutproben zu filtrationsbedingten Problemen kommt. Weiter gestützt wird dies dadurch, dass abzentrifugiertes Serum auch messbar war. Hauptsächlich dürften bei

Liquor und Serum Konzentrationseffekte auftreten, da die Messung auf Vollblut bezogen wird.

Bei höheren Messwerten war zu beobachten, dass die Abweichungen zwischen photometrischer Überprüfung im Labor der Toxikologie und Handgerät tendenziell größer wurden. Der Messbereich des Teststreifenverfahrens ist offenbar auf etwa 6 mmol/l begrenzt, ein Bereich, bei dem die Diagnose Ketose schon aufgrund des Schnelltestes als sicher angesehen werden kann.

Die Anzahl der Messungen war begrenzt, da nicht immer Teststreifen in ausreichender Anzahl zur Verfügung standen, um alle Möglichkeiten systematisch auszutesten. Insgesamt zeigte sich in Form des „Bed-side-Tests“ mit Teststreifen ein sehr gutes Verfahren, welches sich als Vortestgerät direkt am Obduktionstisch gut einsetzen lässt und hierbei eine Möglichkeit bietet frühzeitig weitere Untersuchungen und eine adäquate Asservierung zu veranlassen.

3.3. Semiquantitativer Urin-Teststreifen („Keto-Diabur-Test“)

Der ketonempfindliche Teil des Teststreifen des "Ketodiabur"-Testes (Roche Ketodiabur 5000) basiert auf einer Natrium-Prussid Reaktion, die bei Vorliegen von Acetoacetat bzw. Aceton mit einem lila Farbumschlag reagiert. Auf BOHB reagiert dieser Test nicht, da hier keine entsprechende Reaktion stattfindet. Auf dem Teststreifen wird gleichzeitig semiquantitativ die Uringlucose bestimmt.

Es erfolgte eine Überprüfung, ob die Bewertung des Farbumschlags bei Überprüfung einer Urinprobe, gewonnen im Rahmen von Obduktionen, mit einer späteren Messung von Aceton im Begleitstoffverfahren übereinstimmt. Dabei zeigte sich bei 31 durch HS-GC überprüften Fällen folgende Verteilung :

Ergebnis	Teststreifen	HS-GC als Aceton	%	Teststreifen
Pos./>5,1mg/l	4	10	40	60% falsch negativ
Pos./>51 mg/l	3	5	60	40% falsch negativ
Neg./<5,1 mg/l	24	16	66,6	
Σ	31	31	100	

Tabelle 3.2 Keto-Diabur-Urin-Teststreifen Validierung

3.4. Praktische Anwendung bei rechtsmedizinischen Fragestellungen

Die vorgestellten Methoden werden gegenwärtig sehr unterschiedlich angewandt. Während der semiquantitative Streifentest am Urin relativ regelmäßig zur Anwendung kommt, hat sich der quantitative Bedside-Test für BOHB (z.B. Precision Xtra) bislang in der rechtsmedizinischen Routine nicht etabliert. Üblicher Untersuchungsgang bei dem Verdacht auf das Vorliegen einer Stoffwechsellage ist die Bestimmung von Insulin, C-Peptid, Glucose im Blut, Lactat im Liquor und ggf. Fructosamin und HbA1c. Auf evtl. erhöhte Acetonspiegel wird gaschromatographisch im Rahmen einer routinemäßigen Blutalkohol- und Begleitstoffuntersuchung geprüft. Erhöhte Werte werden dann mittels Begleitstoffanalyse überprüft und quantifiziert. Stellen die Parameter der Insulindiagnostik bei derartigen Fragen die tragende Rolle, gilt dies jedoch nicht für Stoffwechsellagen, bei denen die Ketoazidose im Vordergrund steht. Hier finden sich keine deutlich abnormen Spiegel von Insulin, Glucosespiegel sind postmortal u.U. nur eingeschränkt verwertbar und interpretierbar, so dass die Diagnose einer Ketoazidose allein auf der Diagnose der Ketonkörper beruht. Postmortale pH-Messungen sind von vornherein problematisch.

Zur konkreten Anwendung und praktischen Erprobung der Messmethoden wurden stichprobenartig und soweit zugänglich Fallbeispiele aus dem routinemäßigen Sektionsbetrieb herangezogen.

3.4.1. Fallbeispiele aus dem Sektionsgut

(Sektionsnummer/Jahr, Geschlecht, Arbeitsdiagnose, Blutspiegel im Oberschenkelveneblut [mmol/l], soweit nicht anders angegeben)

2459/01 m, 56 Unterkühlung

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
0,11	0,07	0,49	0,67	7,2	1,57 ‰

Vorgeschichte:

56 Jahre alt gewordener Patient, im Freien im Winter ca. 22 Stunden nach letztmaligem Kontakt tot aufgefunden.

Wesentliche Befunde:

Leuchtend rote Verfärbungen und Hautabschürfungen an beiden Unterschenkeln und Kniegelenken,

punktförmige Andauungen der Magenschleimhaut mit Schwarzfärbung,

Blutungen in der Beinhebermuskulatur,

Prallfüllung der Harnblase (1000ml)

akute passive Blutüberfüllung der inneren Organe,

Hirnvolumenvermehrung mit Zeichen von Hirndruck,

Obduktionsdiagnose:

Makromorphologisch nicht eindeutig, Hinweise für Tod durch Erfrieren. Längere

Bewusstlosigkeit wird wegen des Füllungszustandes der Harnblase diskutiert,

Ein halbquantitativer Zuckertest am Urin verlief negativ, auch für Ketonkörper.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Relevanter Anstieg von BOHB in einen Bereich, der für längere Nahrungskarenz

beschrieben wird. Bei fehlenden Vorerkrankungen, die den Anstieg anderweitig erklären

könnten, ist – nicht zuletzt aufgrund der vollen Harnblase - von einer längeren Phase bis zum Todeseintritt auszugehen. Todesursache Erfrieren, beschleunigt durch Alkoholisierung. Erhebliche Diskrepanz zwischen halbquantitativem Ketonkörperschnelltest und HSGC, da kein relevantes AcAc, sondern nur BOHB. Als Ursache hierfür ist eine Abbauehemmung des BOHB durch das hohe Redoxpotential aus dem Ethanolmetabolismus anzunehmen.

2440/01 m, 61 Unterkühlung

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
4,23	3,82	4,06	12,10	1,1	0,10 ‰

Urin 569,2 mg/l Aceton = 9,67 mmol/l

Vorgeschichte:

61 Jahre alter Mann, im Winter 600m entfernt von seinem PKW liegend aufgefunden worden, Fahrzeug in Schneewehe feststeckend. St.n. Schlaganfall im Sommer des gleichen Jahres, Herzprobleme.

Wesentliche Befunde: Leiche eines Mannes in fortgeschrittenem Lebensalter, reduzierter Körperbau: 165 cm, 56,8 kg.

Auffallende hellrötliche Tönung der spärlichen Totenflecke.

Hellrötliche Verfärbung der Knieregion, rechts stärker als links.

Zeichen notärztlicher Maßnahmen,

Relativ helles Blut im Bereich der Blutleiter des Gehirns und der Lungen.

Hellrötliche Färbung der Lungen.

Fleckförmige Einblutungen in die Magenschleimhaut.

Fleckförmige Einblutungen im Bereich der Lendenmuskulatur.

Großflächige Verwachsungen der Lungen beidseits.

Generalisierte Gefäßerkrankung, älteres Hirninfarktareal rechtsseitig in Höhe der Capsula interna.

Fortgeschrittene Einengung der Herzkranzgefäße, feinstreifige Fibrose des Herzmuskels, geringe Magenfüllung, Harnblasenfüllung gut 700 ml.

Vortests auf Glucose und Ketonkörper in Urin, Glaskörperflüssigkeit sowie

Rückenmarksflüssigkeit: lediglich im Urin einfach positiver Ketontest, ansonsten negativer Verlauf.

Obduktionsdiagnose:

Makromorphologisch nicht eindeutig, deutliche Hinweise für Erfrieren.

Diagnose mit zusätzlicher Analytik:

Höchstgradig erhöhtes BOHB und AcAc, Konzentrationsbereich einer manifesten Ketoazidose, durch alleinige Nahrungskarenz nicht erklärbar. Prolongierte Hypothermie in Kombination mit Ketoazidose, erhebliche Liegezeit nicht ausschließbar.

Eine alleinige Acetonbestimmung wäre nicht auffällig verlaufen.

0018/02 m, 32 Diabetische Ketoazidose

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
7,98	1,52	4,10	13,5	2,7	0,01 ‰

30,1 mg/l (0,49 mmol/l) Isopropanol

Vorgeschichte:

32 Jahre alter Mann, wird bewusstlos ins KH eingeliefert. Die Lebensgefährtin sei nur kurz im Keller gewesen und habe ihn dann bewusstlos aufgefunden. In der letzten Zeit habe er 2 Tage über starke Kopfschmerzen und über Erbrechen geklagt. Er habe einen insulinpflichtigen Diabetes gehabt.

Da es ihm schlecht gegangen sei, sei schon am 1.1.02 gegen 18 Uhr der ärztliche Notdienst dort gewesen und habe ihm etwas gegen Erbrechen gegeben.

Der Betroffene sei früher als zur Drogenszene gehörig gezählt worden.

Obduktionsbefunde:

höchstgradig positiver Zuckertest im Urin (mehr als 5 g%),

schwach positiver Test auf Ketonkörper im Urin,

steife Hirnschwellung,

intensive gelbliche Verfärbung des Schädeldaches,

verkleinerte Bauchspeicheldrüse,

blutige Entzündung der Schleimhaut am Übergang der Speiseröhre zum Magen,

hämatinisiertes Erbrochenes,

Einatmung von hämatinisiertem Erbrochenem in oberen Atemwegen, untere Atemwege ohne Speisebreieinatmungsherde,

100 ml hämatinierter Mageninhalt,

zartes Blutgefäßsystem, Verfettung der Leber, flüssiges Leichenblut,

sog. Schockzeichnung der Nieren,

Obduktionsdiagnose:

Pathologisch-anatomisch keine eindeutige Todesursache. Teilweise könne die Einatmung von erbrochenem blutigem Material für den Todeseintritt letztendlich eine Rolle gespielt haben.

Hinweise für lang bestehende Zuckerkrankheit. Höchstgradig positiver Test auf Zucker im Urin. Auch der Test auf Ketonkörper im Urin war positiv. Insofern könnte geschlussfolgert werden, dass eine Entgleisung des Zuckerstoffwechsels letztlich für den Tod eine relevante Rolle gespielt hat, evtl. sogar die alleinige Todesursache darstellen könnte, wenngleich die zeitlichen Verhältnisse nach ersten Erkenntnissen nicht zwingend in diese Richtung sprechen. Intoxikation nicht ausschließbar.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Todesursache diabetische Ketoazidose bei höchstgradig erhöhten Ketonkörpern, insbesondere BOHB bei damit in Einklang liegenden Organbefunden. Erbrechen und Aspiration eher als agonal bzw. als Folge der Ketoazidose zu werten. Der erhöhte Isopropanol-Wert ist auf eine vitale reduktive Bildung aus Aceton zurückzuführen, welche auch ohne Stoffwechselbelastung durch Ethanol stattfindet.

2158/00 m, 36 Diabetische Ketoazidose

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
14,3	10,2	6,9	31,5	2,7	0,00 ‰

Isopropanol 36mg/l (0,59 mmol/l) OSV

Glucose Herzblut 824 mg/dl

Insulin <3 mikroE/ml, C-Peptid unterhalb der Nachweisgrenze

Vorgeschichte:

36 Jahre alter Mann, wird bewusstlos in seiner Wohnung aufgefunden, verstirbt ca. eineinhalb Stunden später auf der Intensivstation.

Wesentliche Obduktionsbefunde:

41,6 kg, 166 cm ; gelbliche Verfärbung der Schädelkalotte, positiver Streifentest auf Ketone und Glucose im Urin, nicht mehr abgrenzbare Bauchspeicheldrüse, 1,5 l schwärzliche Flüssigkeit im Magen mit kaffeersatzartigen Bestandteilen, Zeichen von Hirndruck

Obduktionsdiagnose:

Pathologisch-anatomisch keine Todesursache. Hinweise für Entgleisung des Zuckerstoffwechsels.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Ketoazidose als Komplikation der Grunderkrankung Diabetes mellitus Typ 1.
Nebenbefundlich erhöhtes Isopropanol als Nebeneffekt der Acetonbelastung.

450/02 w, 53 Bronchopneumonie/ infektassoziierte Ketoazidose

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
9,2	4,2	1,5	15,0	0,3	0,00 ‰

Isopropanol 42 mg/l (0,69 mmol/l)

Keine Glucosemessung

Vorgeschichte:

Frau M. sei seit ca. 1 Woche an einem grippalen Infekt erkrankt gewesen. Wegen eines starken Hustenanfalles habe sie sich in der Nacht vom 7.3. auf 8.3.02 im Wohnzimmer eine Liegestatt hergerichtet. Dort sei sie am 8.3.02 gegen 06.00 Uhr von ihrem Gatten am Boden liegend vorgefunden worden. Der Gatte hat angegeben jedoch einen leichten Pulsschlag verspürt zu haben, auch habe eine Schnappatmung bestanden. Frau M. sei nicht ansprechbar gewesen. Der sofort herbeigerufene Notarzt habe Reanimationsbemühungen unternommen und Frau M. in das Klinikum Rosenheim verbracht, wo um 07.50 Uhr der Tod festgestellt worden sei. Innerhalb eines Jahres soll Frau M. ohne Ernährungsumstellung ca. 30 kg Gewicht abgenommen haben.

Wesentliche Befunde:

Hochgradiger Glucosegehalt des Urins (mindestens 5 g %),
schleimig-eitrige Entzündung der oberen und unteren Luftwege,
nicht sehr umfangreiche, konfluente Bronchopneumonie,
z.T. flächenhafte, z.T. zirkumskripte Einblutungen in das Lungengewebe,
Blutaspiration in Kombination mit fraglicher Lungenquetschung (bei Zustand nach Reanimation), deutliche Vergrößerung der Lymphknoten an der Aufteilungsstelle der Luftröhre, deutliche allgemeine Arteriosklerose mit besonderem Befall der großen Körperschlagader, Hirnvolumenvermehrung mit Zeichen akuten Hirndrucks,

Obduktionsdiagnose:

Nach dem Ergebnis der gerichtsmedizinischen Untersuchung des Leichnams ist Frau M. an Herz-Kreislaufversagen als Folge einer schleimig-eitrigen Entzündung der Luftwege und

Lungenentzündung (Bronchopneumonie) in Verbindung mit einer Entgleisung des Blutzuckerstoffwechsels auf natürliche Weise verstorben.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Ketonkörpersumme deutlich erhöht, jedoch ist BOHB in einem Bereich der eher an eine abklingende Ketose denken lässt. Der erhöhte Hirndruck ließe sich sowohl über eine Ketoazidose, als auch über prolongierten Sauerstoffmangel erklären. Eine eindeutige Klärung ist also hier nicht möglich. Die erhöhten Spiegel ließen sich auch gut mit einer reduzierten Nahrungsaufnahme aufgrund der Grunderkrankung vereinbaren.

483/01 w, 36 Gastrointestinale Hämorrhagie (Gerinnungsstörung ?)

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
4,6	0,7	0,5	5,8	0,7	0,00 ‰

Isopropanol 13,2 mg/l (0,21 mmol/l)

Vorgeschichte:

Frau ...habe am 11.3.01 über Bauchschmerzen geklagt, sei jedoch nicht zum Arzt gegangen. Am 13.3.01 gegen 18.00 Uhr sei sie von einer Wohnungsmitbewohnerin in ihrem Zimmer schwach atmend auf dem Boden liegend vorgefunden worden. Sie habe Blut erbrochen gehabt. Der Notarzt sei hinzugezogen worden; er habe noch Reanimationsversuche durchgeführt, jedoch den Tod nicht verhindern können.

Vorbestehende Krankheiten seien nicht bekannt.

Wesentliche Befunde:

- Magenschleimhauterosionen,
- kaffeesatzartiger Magen- und Darminhalt,
- kaffeesatzartiger Inhalt in der Speiseröhre,
- kaffeesatzartiger Belag in der Luftröhre,
- Punktblutungen im Peritoneum und in der Gekrösewurzel,
- Punktblutungen in der Schleimhaut des Nierenbeckens,
- Zeichen von Hirndruck,
- flüssigkeitsreiche Lungen,
- Blässe der inneren Organe, insbesondere der Nieren,
- feste Milz,
- Kryptentonsillitis,
- Zustand nach Versuchen der Wiederbelebung.

Obduktionsergebnis:

Nach dem Ergebnis der gerichtsmedizinischen Untersuchung der Leiche ist Frau ... an Verbluten nach innen bei einer hämorrhagischen Magenschleimhautentzündung auf natürliche Weise verstorben.

Differentialdiagnostik mit zusätzlicher Analytik:

Keine relevanten ergänzenden Befunde, Ketonkörper nicht relevant erhöht, allenfalls mit längerer Nahrungskarenz vereinbar und insofern in Einklang mit Vorgeschichte und Obduktionsbefunden.

390/02 m, 39 Subdurales Hämatom

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
0,2	0,1	0,1	0,36	0,9	0,00 ‰

Vorgeschichte:

Nach Aktenlage sei Herr B. am 27.2.02 um 21.30 Uhr tot in seinem völlig verwahrlosten Zimmer ausgefunden worden.

Herr B. sei seit Jahren psychisch krank gewesen. Unter anderem habe er mehrfach jegliche Nahrungsaufnahme verweigert. Der letzte stationäre Aufenthalt im Bezirkskrankenhaus Haar habe bis zum 1.3.00 angedauert. Seitdem habe sich Herr B. in seinem Zimmer in der Wohnung seiner Mutter eingeschlossen gehabt. Er habe das Zimmer nicht mehr verlassen. Die Mutter habe ihm das Essen und Trinken immer vor die Türe stellen müssen. Zuletzt habe sie am 25.2.02 durch die verschlossene Tür mit ihm gesprochen. Letztmals lebend gesehen habe sie ihn am 1.3.00.

Wesentliche Befunde:

ausgedehntes subdurales Hämatom links (110 g),
 Hirnvolumenvermehrung mit Zeichen hochgradigen Hirndrucks,
 Hämatom-bedingte Kompression der linken Großhirnhälfte mit Mittellinienshift nach rechts und Verkantung des Hirnkammersystems,
 hochgradige trophische Störungen im Bereich beider Unterschenkel und Füße mit ausgeprägter derber Schwellung,
 weitgehend zartes Gefäßsystem,

Gallensteinleiden,
erhebliche Schwellung der Milz,
Knotenkropf,
beginnende Leichenfäulnis.

Obduktionsdiagnose:

Nach dem Ergebnis der gerichtsmedizinischen Untersuchung der Leiche ist Herr an zentralem Regulationsversagen als Folge eines linksseitigen subduralen Hämatoms auf gewaltsame Weise verstorben.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Keine relevante Erhöhung der Ketonkörper, Spiegel gut vereinbar mit mittelgradig langer agonaler Phase.

417/02 m, 46 makromorphologisch unklar, V.a. plötzlichen Herztod

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
2,0	2,7	0,8	0,36	0,3	0,00 ‰

Vorgeschichte:

Am 3.3.02 sei gegen 3 Uhr Herr an einer Bushaltestelle sitzend aufgefunden worden, er hätte schwer geatmet, sei nicht ansprechbar gewesen. Passanten hätten den Notarzt gerufen. Er sei dann gegen 4.30 Uhr im Krankenhaus verstorben. Man hätte bei ihm Tabletten, ein Antidepressivum (Doxepin) aufgefunden.

Wesentliche Befunde:

166 cm, 72,8 kg.

Blutstau innerer Organe, Hirnödem, Lungenödem.

Geringe Magenfüllung mit weißlichen und schwärzlichen Stippchen, keine eindeutig zuordenbaren Tablettenreste.

Relativ großes, muskelkräftiges Herz. Verdickung der Mitralklappensegel mit Verkürzung und Verplumpung der Sehnenfäden, offensichtlich Mitralsuffizienz. Ausweitung des linken Vorhofes.

Relativ große, feste Milz.

Geringe Harnblasenfüllung.

Fleckförmige Einblutung in die Magenschleimhaut.

Kleines Gallenblasenkonkrement.

Obduktionsdiagnose:

Die im Rahmen der gerichtlichen Leichenöffnung des Wolfgang Tauber makromorphologisch erhobenen Befunde lassen eine abschließende, sichere Benennung einer Todesursache nicht zu. Verdacht auf akutes Herzversagen bei Herzhypertrophie und Mitralinsuffizienz.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Bezüglich Ketonkörper mäßig auffälliger Befund, allerdings Zustand nach ausgedehnten Reanimationsmaßnahmen mit Gabe von Epinephrin in hoher Dosierung, mit bekannten lipolytischen und glykolytischen Effekten. Ketonkörper Spiegel könnten hier zwar auch über eine vorangegangene Stoffwechselstörung zu erklären sein, was aber nicht mit Sicherheit zu belegen wäre. Auch stellen sich die Spiegel vor dem Hintergrund einer zumindest teilweise durch Epinephrin bedingten Erhöhung nicht als so gravierend erhöht dar, dass damit der Tod erklärbar wäre.

467/02 m, 49 kombinierte alkoholische/ diabetische Ketoazidose, Herzinsuffizienz

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
3,0	2,1	3,1	8,2	1,5	0,00 ‰

Vorgeschichte

Herr K. leide an einem insulinpflichtigen Diabetis mellitus und trinke gerne Alkohol.

Ende 2001 bis Anfang 2002 sei er in Haar stationär zum Entzug behandelt worden.

Am 8.3.02 sei er letztmals lebend gesehen worden.

Am 12.3.02 gegen 14.45 Uhr habe sein Bruder ihn in der Küche auf dem Boden liegend leblos aufgefunden.

Wesentliche Befunde:

Auf Keton und Zucker positiver sogenannter Ketodiaburtest am Urin,
weitgehend zurückgebildete und bindegewebig durchwachsene Bauchspeicheldrüse,
fleckförmige oberflächliche Schleimhauterosionen am Magen,
Zeichen von Hirndruck,
ausgeprägtes Lungenödem, rechts deutlicher als links,
mäßiggradige allgemeine Arteriosklerose,
Blutarmut innerer Organe,

nicht mehr frische Einblutungen in die Weichteile, in Kopf, Hals- und Brustbereich,
herabgesetzter Ernährungszustand,
nicht mehr frische Rippenbrüche rechts,
Fettleber.

Obduktionsdiagnose

Eine eindeutig anatomisch nachweisbare Todesursache konnte anlässlich der Obduktion des Herrn K. nicht festgestellt werden.

Als wesentlicher Befund zeigte sich allerdings eine hochgradige Rückbildung und ein hochgradiger Umbau der Bauchspeicheldrüse sowie ein auf Zucker und Ketonkörper positiver Urin.

Insgesamt zeigten sich Befunde, die sich mit einem Tod infolge Entgleisung des Zuckerstoffwechsels in Einklang bringen lassen.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

BOHB-Spiegel von 3,1 mmol/l und eine Ketonkörpersumme von 8,2 mmol/l hier als spezifisch für eine Ketoazidose zu werten. Fragliche Pankreasinsuffizienz bzw., Entzugskomplikationen wären hier als Erklärungen plausibel. Die Organbefunde legen nahe, dass es u.U. zu einer protrahierten akuten Herzinsuffizienz, fraglich aufgrund der Azidose, gekommen ist.

668/02 w, 46 Pankreatitis

Aceton	Acetoacetat	BOHB	KBS	KBR	BAK
6,5	1,2	5,1	12,8	4,4	0,00 ‰

Vorgeschichte:

Frau L. ist am 11.04.2002, gegen 01.00 Uhr, von ihrem Ehemann in der Küche tot aufgefunden worden. Die 46-Jährige habe über Bauchschmerzen seit einer Woche geklagt und habe nur noch Tee getrunken. Sie sei deswegen beim Arzt gewesen, möglicherweise bereits vor einer Woche. Der Arzt habe nur irgendwelche Tabletten (offenbar Kohletabletten) verschrieben.

Wesentliche Befunde:

Etwas Speisebrei in den oberen und unteren Atemwegen,
 Zeichen des Erbrechens von Speisebrei,
 ausgedehnte Speisebreieinatmungsherde beidseits,
 entzündlicher Zerfall der Bauchspeicheldrüse im Kopfbereich mit erheblicher Schwellung,
 ausgedehnte Fettgewebsnekrosen in der Umgebung, im Bereich der Nierenkapseln und im Bereich des großen Netzes,
 Fettleber mit erheblicher Vergrößerung,
 geringe Lockerung der Milz,
 äußere Hirnatrophie,
 zartes Blutgefäßsystem,
 Zustand nach operativer Entfernung der Gaumenmandeln und des Wurmfortsatzes vor langer Zeit.

Obduktionsdiagnose:

Frau L. ist infolge einer akuten Bauchspeicheldrüsenentzündung auf natürliche Weise verstorben. Im Rahmen des Krankheitsbildes hat die Betroffene sich erbrochen und noch größere Mengen von Speisebrei eingeatmet, so daß der eigentliche Todeseintritt durch die Speisebreieinatmung bedingt war.

Als besonderer Befund fand sich eine erhebliche Verfettung der Leber, die zwingend daran denken läßt, daß die Betroffene schon lange Zeit Alkoholmißbrauch betrieben hat.

Differentialdiagnose mit zusätzlicher Analytik:

Stoffwechselbedingte Azidose im Sinne einer diabetischen Ketoazidose auf der Grundlage einer fortgeschrittenen Pankreatitis. Längere Nahrungskarenz in der Vorgeschichte und zu unterstellender Insulinmangel decken sich gut mit den Befunden. Trotzdem werden erhebliche Spiegel erreicht.

1922/02 m, 1972 Diabetische Ketoazidose

(Messungen im klinischen Labor über photometrisches Verfahren, da Gutachtensauftrag)

Vorgeschichte:

Der 29jährige Patient wird in seiner Wohnung tot aufgefunden, fremdanamnestisch ist zu eruieren, dass er insulinpflichtiger Diabetiker seit seiner Jugend gewesen sei und einen grippalen Infekt gehabt habe. Bei der Obduktion findet sich keine anatomisch eindeutig nachweisbare Todesursache.

Obduktionsdiagnose:

An pathologischen Befunden ergeben sich ein 3fach positiver Streifen-test auf Glukose im Liquor und Herzblut. Die quantitative Messung ergibt 372mg/dl im Herzblut, β -Hydroxybutyrat 4,2 mmol/l, hochgradige Füllung der Harnblase, Magenschleimhauterosionen, Zeichen deutlichen Hirndrucks, gelbliche Verfärbung der inneren Schädelkalotte, deutliche allgemeine Arteriosklerose mit bereits teilweise lichtungseinschränkender Koronararteriosklerose, Rötung der oberen und unteren Atemwege, Lungenödem, fahle Niere mit feinhöckriger Oberflächenveränderung.

Diagnose mit zusätzlicher Analytik:

Glucosespiegel in der Glaskörperflüssigkeit 1124 mg/dl, Herzbeutel-flüssigkeit 1450 mg/dl, Liquor 824 mg/dl, Urin 2934 mg/dl. Ferner war Insulin unterhalb der Nachweisgrenze (3,0 microE/ml) und C-Peptid im Herzblut mit 0,5 ng/ml nicht in relevanter Menge nachweisbar. Zusammenfassend lassen sich diese Befunde dahingehend interpretieren, dass der Patient an den Folgen einer diabetischen Stoffwechsell-entgleisung in Form einer diabetischen Ketoazidose verstorben ist. Als Auslöser darf der grippale Infekt vermutet werden, da Infektionen den Insulinbedarf deutlich erhöhen. Zusätzliche Folgeerkrankungen durch den Diabetes mellitus, Arteriosklerose etc., senken die Kompensationsfähigkeit des Körpers weiter. In diesem Fall ergibt sich eine eindeutige Diagnose, einerseits durch die bekannte Anamnese, als auch durch die noch nachweisbaren massiv erhöhten Zuckerspiegel. Da Glucose im Blut postmortal einem raschen Abbau unterliegt, muss dies nicht zwingend der Fall sein. Besser geeignet zur Messung sind also „trägere“ Kompartimente des menschlichen Körpers. Die „Trägheit“ kann hierbei einerseits anatomisch gegeben sein, wie bei

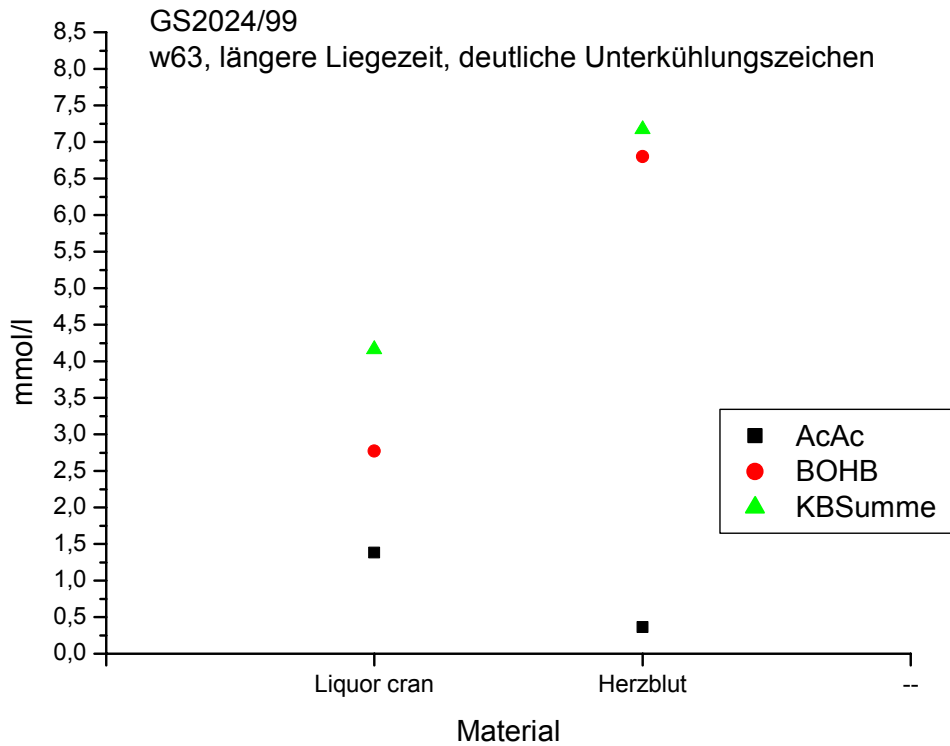
Glaskörperflüssigkeit und Liquor, oder auch biochemisch, wie bei den Ketonkörpern, die nicht einem so rapiden Abbau unterliegen. Da für β -Hydroxybutyrat der quantitative Bedside –Test rasche und hinreichend exakte Ergebnisse bietet, ist er eine in Erwägung zu ziehende Alternative für derartige Fragestellungen. Hierbei ist besonders die einfache und preiswertere Durchführbarkeit im Vergleich zu Untersuchungen auf Insulin und C-Peptid zu erwähnen.

2024/99 w, 63 Hypothermie / Erschöpfung

Mangelnde körperliche Reserven und Kälte

Eine ältere Frau wird auf dem Speicher ihres Wohnhauses im Winter aufgefunden. Die Obduktion ergibt als anatomisch-pathologische Befunde Wischnewski-Flecken der Magenschleimhaut, einen auffällig reduzierten Ernährungszustand, Gesichtsschädelbruch in der linken Augenregion, auffallende Hautrötungsbereiche an beiden Kniegelenksvorderseiten, deutlich positiver, semiquantitativer Streifentest auf Glucose und Ketonkörper im Urin

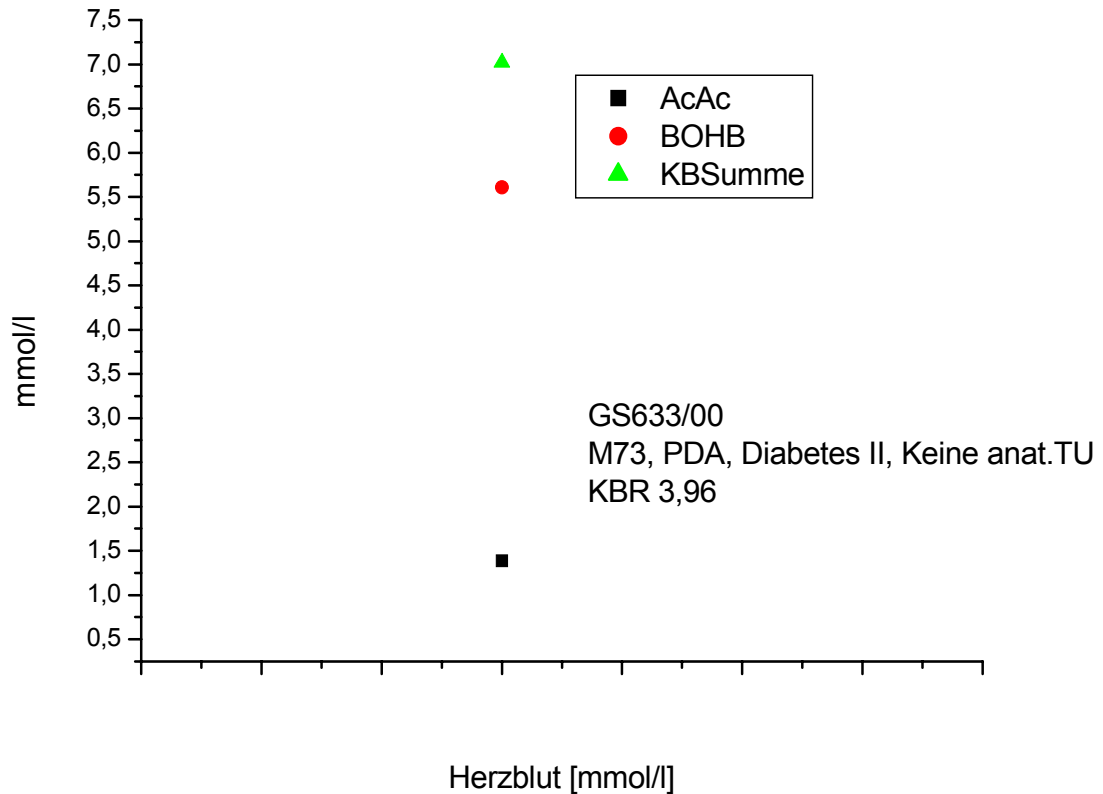
Die Begleitstoffuntersuchung von Liquor und Herzblut ergibt für die Ketonkörper folgende Werte: Herzblut: Acetoacetat 0,36 mmol/l, β -Hydroxybutyrat 6,8 mmol/l, Liquor :Acetoacetat 1,4 mmol/l, β -Hydroxybutyrat 2,8 mmol/l.



633/00 m, 74 Akute Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus II

74 Jahre alter Mann, wird mit der Frage eines Kunstfehlers nach Anlage eines periduralen Katheters obduziert. Bei bekanntem Diabetes mellitus II finden sich vor allem Befunde am Herzen die eine akute Herzinsuffizienz bei fortgeschrittener Koronarsklerose als Todesursache in den Vordergrund rücken lassen. Trotz eines relativ schnell eingetretenen Todes –zumindest laut Vorgeschichte – finden sich hier erhebliche Ketonkörperpiegel.

Herzblut 1,39 mmol/l Acetoacetat 5,61 mmol/l BOHB 7,01 mmol/l Summenwert



3.4.2. Untersuchungen an Alkoholikern im Entzug

In Zusammenarbeit mit der psychiatrischen Klinik wurden an routinemäßig entnommenen Blutproben von Alkoholikern bei stationärer Aufnahme und im Entzug nach oben beschriebenem Verfahren die Werte für die Ketonkörper bestimmt.

Hierbei wurden drei Proben von jedem Patienten untersucht, die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden. Einschlusskriterien für die Fallstudie war die Definition alkoholkrank nach ICD10, im stationären Entzug, sowie Aufnahme mit einem (auf Blutalkohol umgerechneten) Atemalkoholspiegel über 1,0 Promille.

Die erste Blutprobe erfolgte unmittelbar bei der Aufnahme, mit folglich durch Ethanol beeinflusstem Stoffwechsel. Die zweite Probe wurde bei annäherndem Erreichen von 0,0 Promille entnommen. Der Zeitpunkt wurde aus dem anfänglichen Alkoholspiegel rechnerisch abgeschätzt, zumindest innerhalb der interindividuellen Stoffwechselrate für Ethanol war dies hinreichend genau möglich. Die dritte und letzte Blutentnahme erfolgte 4 Stunden nach der Zweiten. Folglich ergibt sich ein Überblick über den Zeitraum der vom Ethanolabbau bestimmten Stoffwechsellage, mit Einbezug der darauf folgenden, nicht mehr direkt ethanolbeeinflussten Zeit. Gleichzeitig wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten eine Skala für den Alkoholentzug (AES) erhoben, um etwaige Entzugserscheinungen zu dokumentieren und eventuell im Zusammenhang mit den durchgeführten Untersuchungen bewerten zu können.

Die Skala erfasst folgende Parameter:

A. Vegetative Symptomatik:

Pulsfrequenz (0:<100, 1:101-110, 2:111-120, 3:>120 4: Herzrhythmusstörungen) [Punkte: relevanter Wert]

Diastolischer Blutdruck (0:<95, 1:96-100, 2:100-105, 3:>105)

Temperatur[°C] (0: <37.0, 1:37.0-37.5, 2: 37.6 – 38.0, 3:>38.0)

Atemfrequenz (0: <20, 1:20-24, 2:>24)

Schwitzen (0: kein, 1: leicht (feuchte Hände), 2: mäßig (Stirn & Gesicht), 3: schwer (profuses Schwitzen)

Tremor (0:kein, 1:leicht, 2:mäßig, 3: schwer)

B. Psychische Symptomatik:

Psychomotorische Unruhe (0:keine, 1: innere Unruhe, 2: Wälzen, Nesteln, 3: will im Bett aufstehen, 4: erregt

Kontakt (0:kann kurzem Gespräch folgen, 1: leicht ablenkbar, 2: schweift andauernd ab, 3: geordnetes Gespräch unmöglich)

Orientierung (0:voll orientiert, 1: eine Qualität gestört, 2: zwei gestört, 3: alle gestört)

Halluzinationen (0:keine, 1: suggestibel, 2: eine Qualität(z.B. optisch), 3: zwei Qualitäten, 4: alle Qualitäten, 5: szenische Halluzinationen („Film“)

Angst (0:keine, 1:leicht, 2:stark (spontan angegeben)

Daraus wird ein psychischer und vegetativer Score gebildet, sowie ein Summenscore. Je höher der Wert desto gravierender der Entzug, soweit über die Entzugserscheinungen zu erfassen.

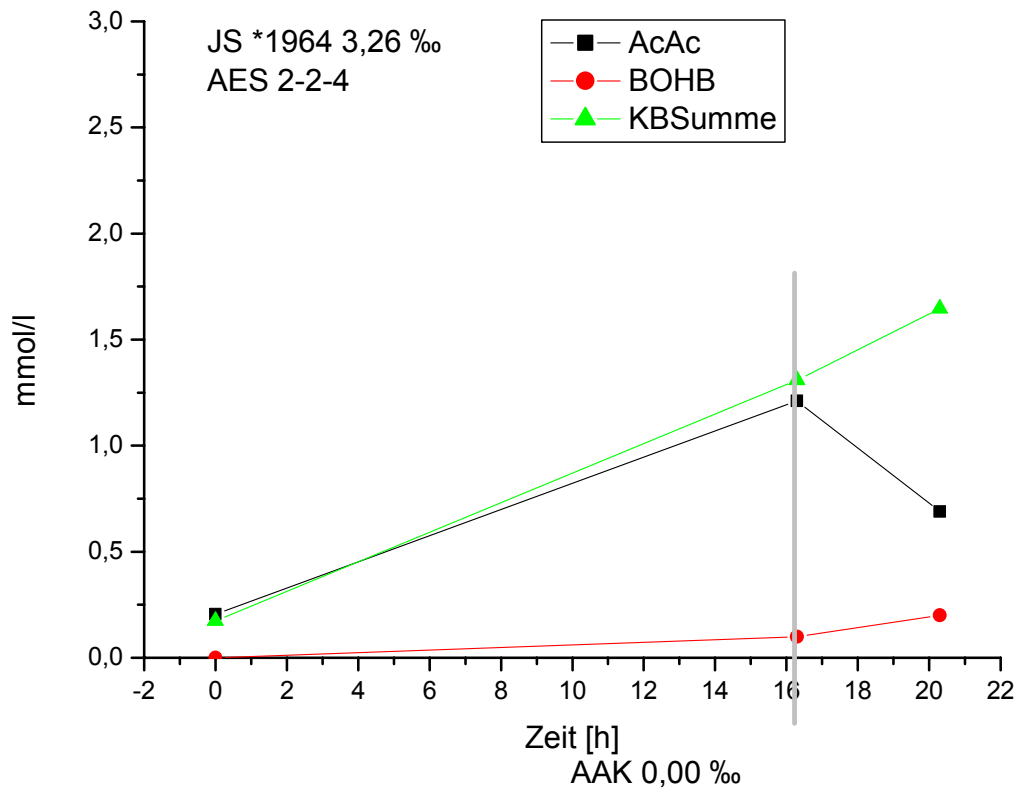
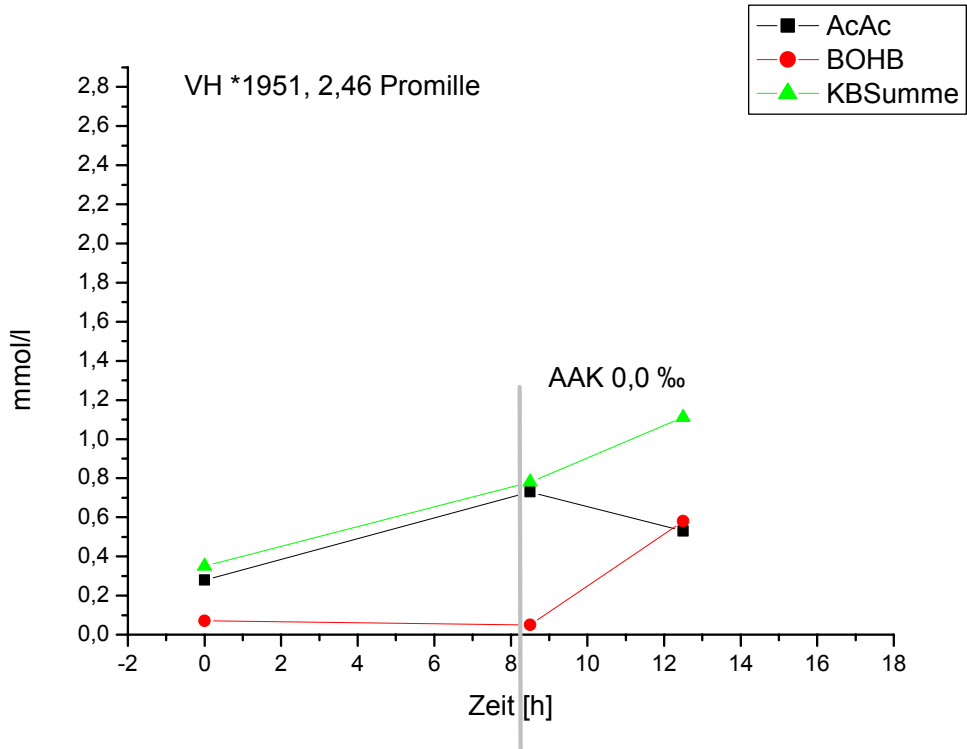
Die Verläufe sind in den Grafiken illustriert.

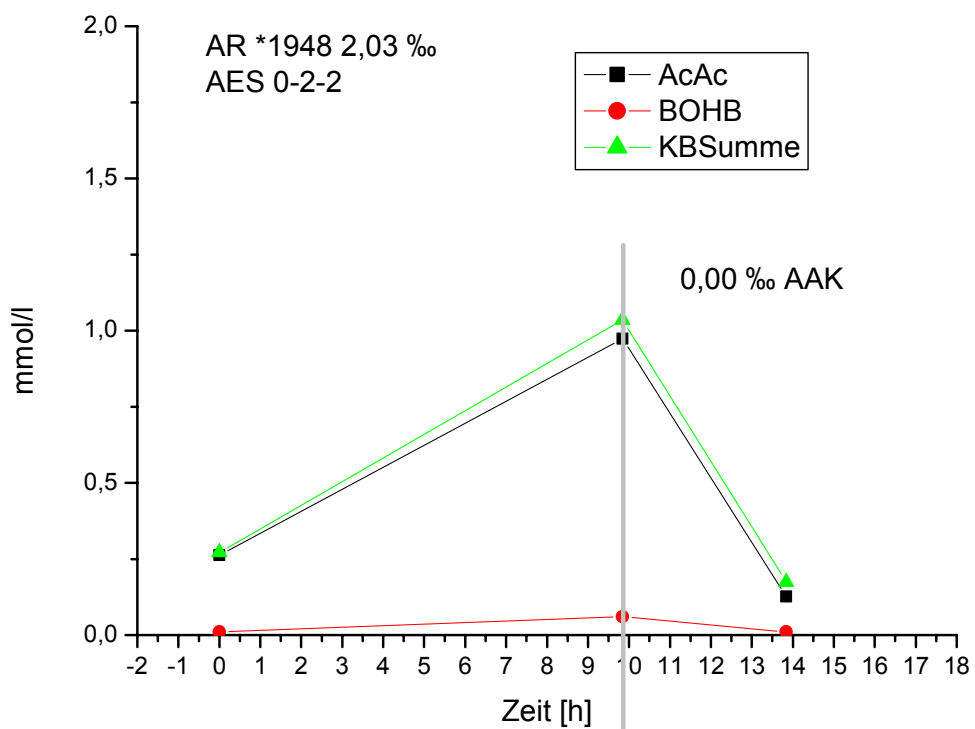
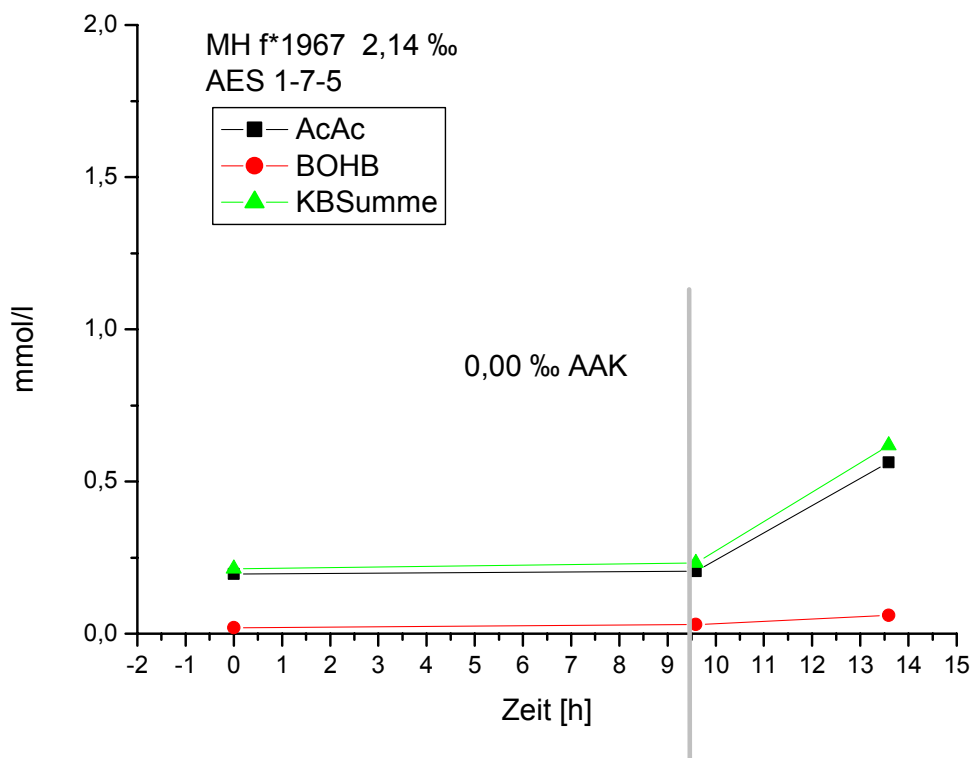
Es zeigte sich, dass, trotz der kleinen Gruppe, erstaunlich regelmäßig erhöhte Ketonkörperwerte zu beobachten waren. Die Ketonkörpersumme wies einen Mittelwert von

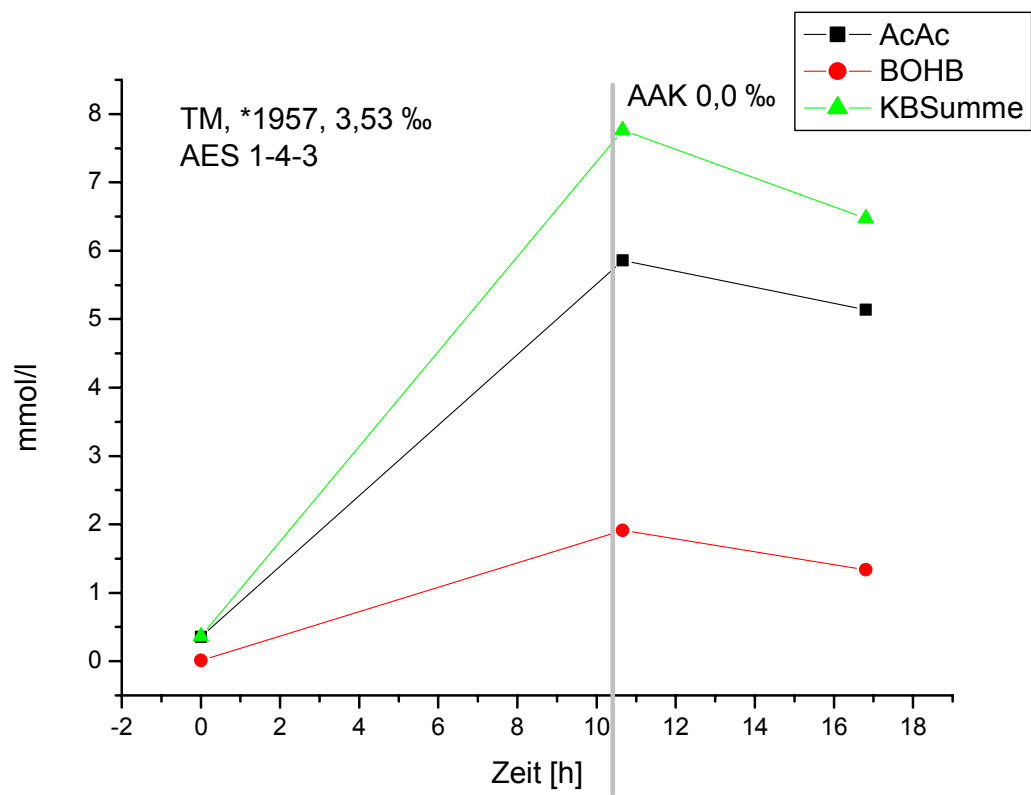
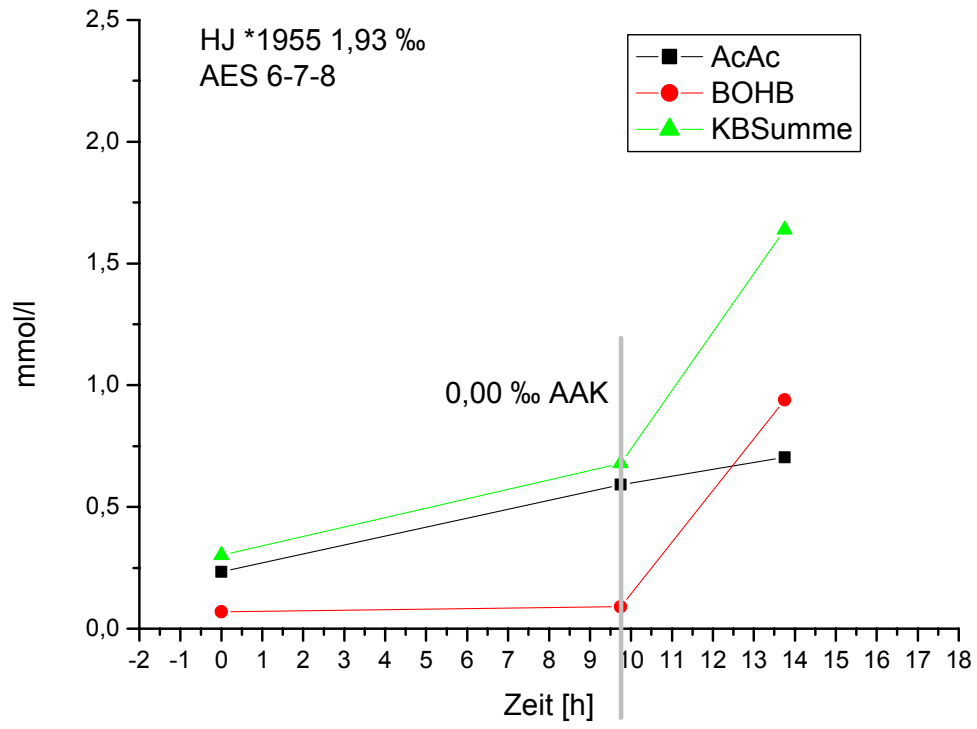
1,75 mmol/l auf. (Min. 0,11 mmol/l, Max . 19,69 mmol/l, Median 0,551). Für BOHB ergab sich ein Mittelwert von 0,45 mmol/l, die Werte reichten von 0 bis 7,5 mmol/l.

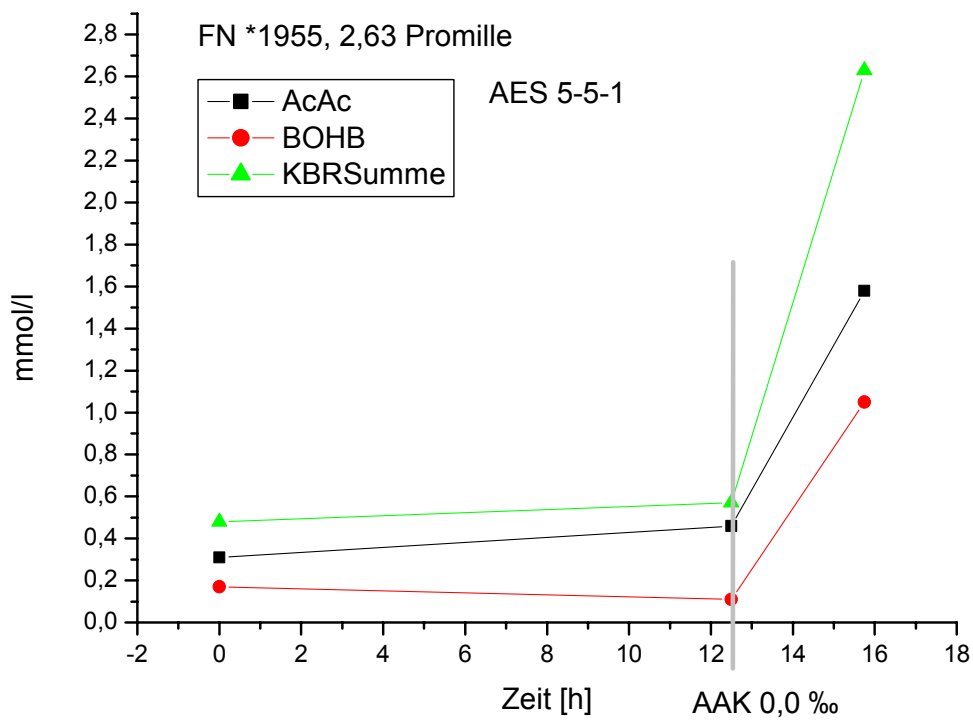
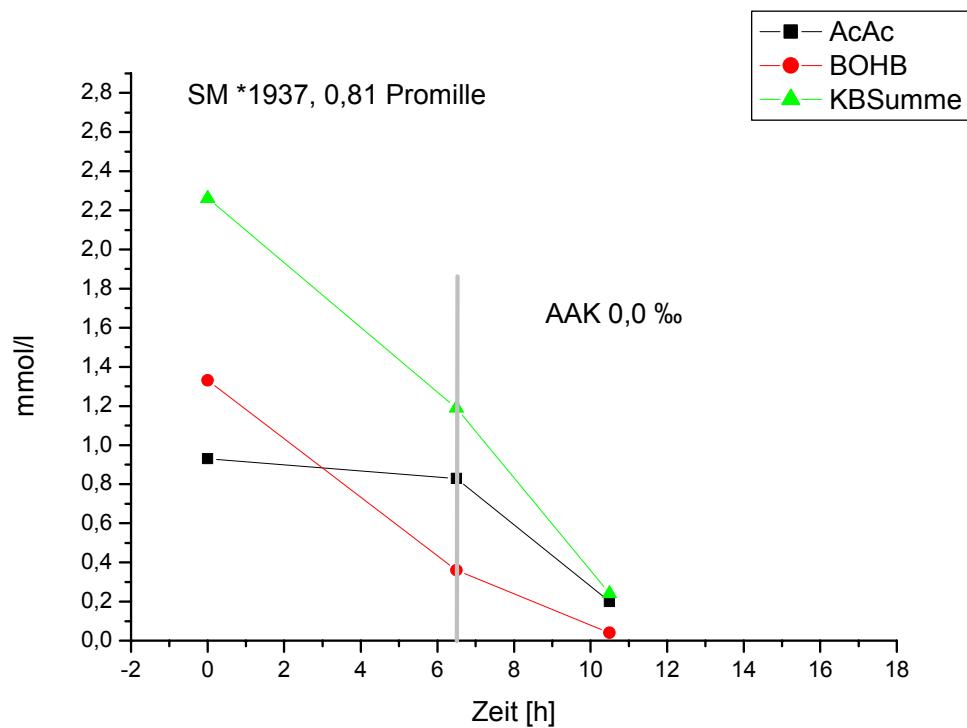
Im Verlauf zeigte sich meist ein Anstieg der Ketonkörper, wobei fast alle Probanden Ausgangswerte der Ketonkörpersumme unter 1 mmol/l aufwiesen. Das häufige Ansteigen, auch unabhängig von beschriebenen Entzugserscheinungen, lässt wieder auf die Rolle der Nahrungskarenz schließen, die zweifelsohne bei diesem Patientengut eine erhebliche Rolle spielt. Auch wenn die Fallzahl viel zu gering ist für definitive Aussagen oder auch nur Tendenzen, so lässt sich zunächst kein auffallender Zusammenhang zwischen Entzugserscheinungen und Verlauf der Ketose erkennen.

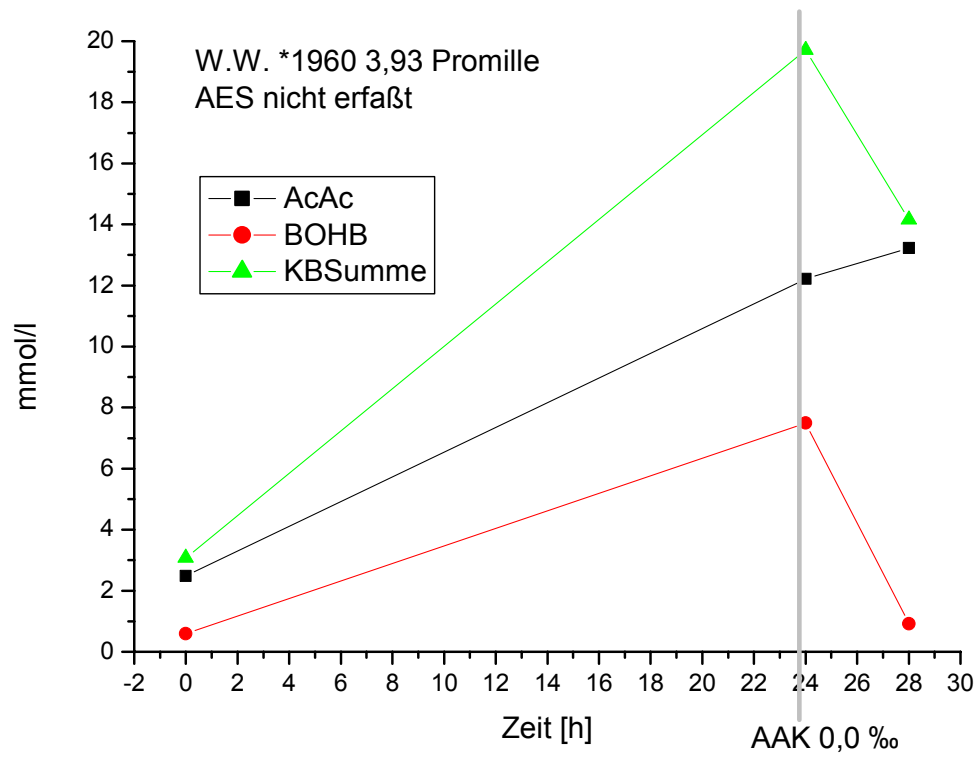
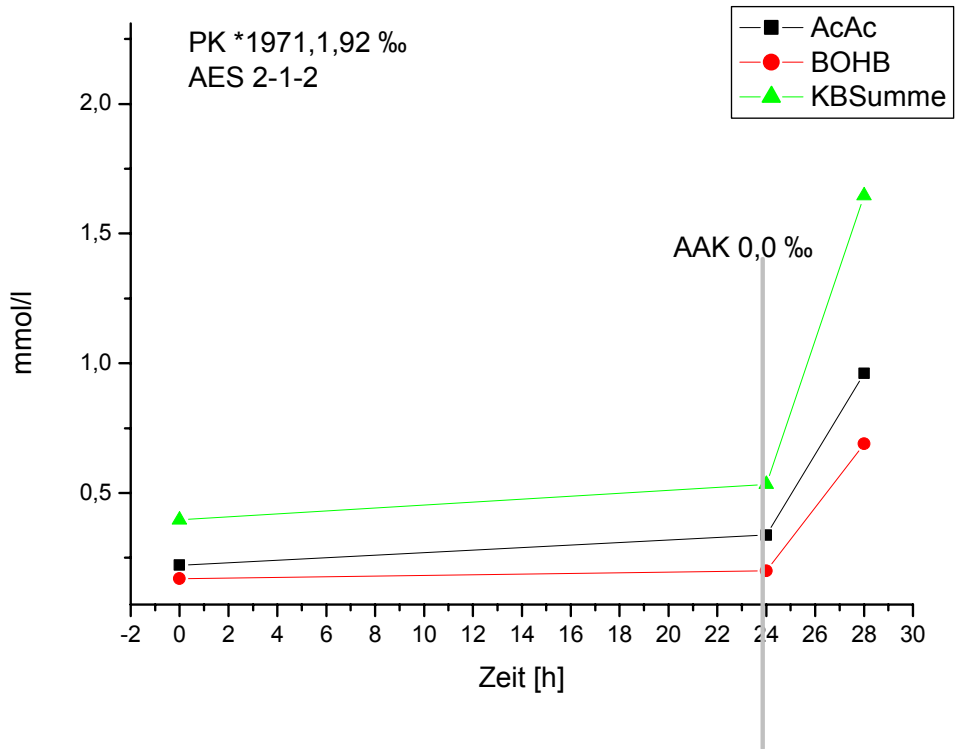
Auffällig war ein einzelner Patient, der zunächst relativ hohe AES-Werte bei mäßigen Ketonkörperspiegeln aufwies, mit Erreichen von 0,0 Promille dann rasch mit den Ketonkörpern anstieg, aber gleichzeitig kaum mehr Entzugserscheinungen aufwies. Zusammenfassend zeigt sich hier, dass die Messung der Ketonkörper vor allem eine Aussage über die Nahrungskarenz bzw. den Fettstoffwechsel liefern kann, mit all ihren möglichen Ursachen und hormonellen Regelzuständen, die bei der Interpretation individuell berücksichtigt werden müssen.

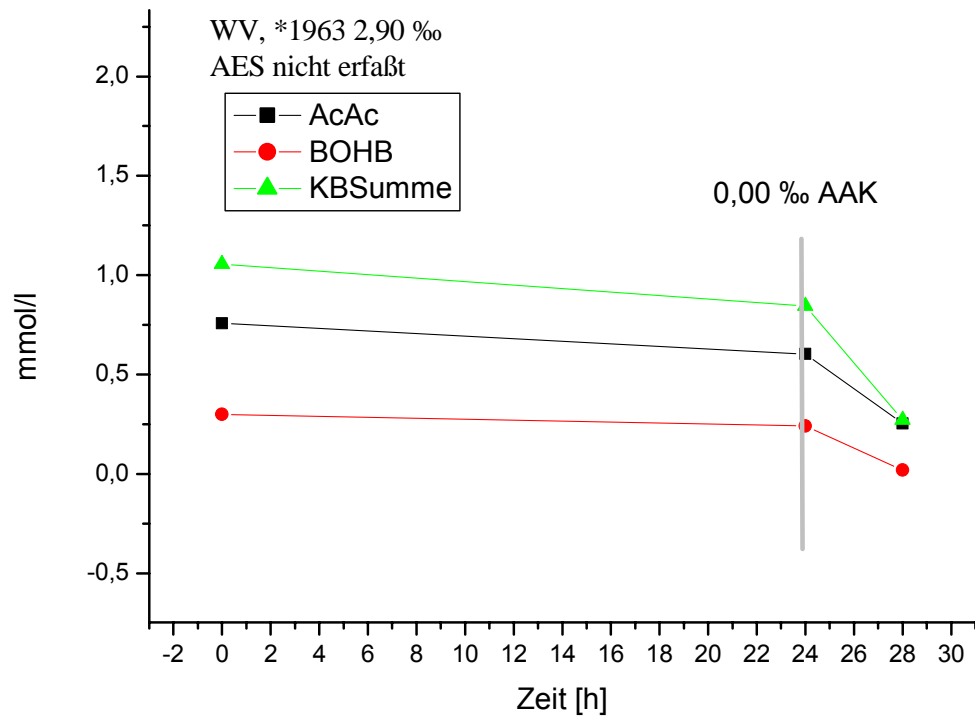












Die Ergebnisse sind detailliert im Anhang aufgeführt.

4. Diskussion

Messmethoden

Die Messmethode erwies sich als gut anwendbar, aber aufwendig in der Durchführung. Der Routinebetrieb eines Labors, welches derartige Untersuchungen mit aufwendigerer Vorbereitung nicht regelmäßig durchführt, ist hierfür nur unter Einschränkungen geeignet. Gleichwohl ließe sich das Verfahren relativ einfach in die Routine einbinden. Im Rahmen der Arbeit wurde ein Set erstellt in dem die benötigten Substanzen in der passenden Konzentration vorgehalten wurden. Die Haltbarkeit zeigte sich über 2-3 Wochen als ausreichend, um die Substanzen verwenden zu können. Die Pyruvat-Lösung ist hier der zeitlich limitierende Faktor, da bei 4°C nur knapp zwei Wochen haltbar. Das Set war so eingerichtet, dass die einzelnen Substanzen nur noch pipettiert und dann dem jeweiligen nächsten Schritt unterzogen werden mussten. Bei routinierter Anwendung der apparativen Ausstattung der HSGC war es damit möglich, die Durchführung derart zu vereinfachen, dass sie zügig vonstatten ging. Es verbleibt dennoch der hohe Zeitaufwand durch die Inkubation und die thermische Zersetzung. Zweiteres ließe sich relativ sicher weiter verkürzen, da man die Temperatur der geschlossenen GC-Gefäße höher wählen könnte. Dies wäre solange steiger- und damit beschleunigbar, bis andere physikalische und chemische Reaktionen das Messergebnis verfälschen. Weitere Optimierungsmöglichkeiten ergäben sich durch optimale Ausnutzung der Temperierungseinheiten moderner Gaschromatographen.

Für die Praxis erwies es sich als sinnvoll und möglich, Proben zu sammeln und diese dann in einem größeren Ansatz zu verarbeiten. Soweit auf eine entsprechende Lagerung geachtet wird, ergeben sich aufgrund der Stabilität der wesentlichen Substanzen, BOHB und Aceton, keine Probleme. Das instabile Acetoacetat geht ohnehin im Rahmen der Messung in Aceton über, so dass es hier nicht sinnvoll erscheint zu versuchen zu, eine diesbezüglich differenzierte Messung durchzuführen. Dies erscheint auch, obwohl Zielsetzung der Arbeit, unter biochemischen Aspekten nicht sinnvoll.

Ein nicht zu vernachlässigender Vorteil der HSGC zeigte sich bei der festgestellten Verunreinigung der ein oder anderen Testsubstanz durch Methanol, da diese hier problemlos erkannt wurden und daher bestimmte Messfehler von vornherein erkannt wurden. Auch in der Routinediagnostik stellt dies einen unschätzbaren Vorteil dar, da man simultan ein „Screening“ der Blutprobe auf flüchtige Substanzen erhält, das für die weitere Diagnostik und auch forensische Bewertung eines Falles zielführend sein kann. Dies stellt sich bei anderen Testverfahren, z.B. dem Streifentest oder photometrischen Verfahren nicht so dar, da hier eine Fehlmessung nur über nachvollziehbar unplausible Werte auffällt. Den Messvorgang

oder die Qualität der spezifischen Untersuchung kann man per se nicht bewerten, was hingegen bei der Gaschromatographie in vielen Fällen möglich ist.

Aceton/ Acetoacetat

Während Felby (Felby and Nielsen) beschreibt, dass die Erwärmung einer Probe auf 60 Grad Celsius in der GC-Probenkolonne das sog. „freie Aceton“ als Messwert liefere, erscheint dies mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ohne weiteres nachvollziehbar. Proben die bis kurz vor der Untersuchung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurden ergaben Abweichungen von bis zu 10%, minimal -bei optimalem Probenhandling mit langer „Kühlkette“ - ca. 6%. Je länger die Proben Raumtemperatur und der GC-Kolonne ausgesetzt waren, desto gravierender die fälschlich als freies Aceton gemessene Konzentration. Auch zeigte sich bei Messungen reiner Acetoacetat-Lösungen, daß ein Ansatz nur mit dieser Lösung und Natriumsulfat ergab, daß bereits um die 10 % (8,3 -13,0 %) des Acetoacetats als Aceton gemessen wurde. Dieser Wert stieg mit der Lagerungszeit deutlich an. Wurden diese Lösungen über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt, stiegen die Werte bis auf ca. 30% des eingesetzten Acetoacetats an. Unter Berücksichtigung von Säurezugabe in Form von Perchlorsäure ergaben sich immer auch zwischen gekühltem „Handling“ und vollständiger Decarboxylation Unterschiede von ca. 71%. Insofern ist hier wiederum ein Parameter offensichtlich, der die Decarboxylation und damit Messung von Acetoacetat erheblich beeinflusst. Möglicherweise spielen hier chemische Gleichgewichtsreaktionen eine Rolle, die bei saurem pH eine leichtere Decarboxylation ermöglichen. Dies bleibt letzten Endes ohne gezielte chemische Analytik ungeklärt, was im Rahmen dieser Arbeit bei weitem nicht möglich war. Es bleibt die Feststellung, dass „freies Aceton“ ein Begriff ist, der sehr vorsichtig interpretiert werden sollte. Aufgrund der thermischen Labilität von Acetoacetat ist dies auch ohne weiteres nachvollziehbar (Fritzsche et al., 2001). Mit den durchgeführten Untersuchungen kann jedoch relativ sicher nachgewiesen werden, ob das Aceton primär ketogenen Ursprungs ist oder aber z.B. über die Aufnahme von Isopropanol entstanden ist.

Was die Interpretation „freien Acetons“ angeht, stehen dem auch praktische Aspekte gegenüber, da eine lange Liegezeit einer Leiche, oder mangelhafte Aufbewahrung oder Versendung einer Probe zu genau diesen Effekten führt und damit zu einer von Zeit und Temperatur abhängigen Erhöhung des „freien“ Acetons. Dies zugrundeliegend, als auch die Tatsache, dass im Regelfall das Aceton aus Acetoacetat entsteht, macht eine regelmäßige, getrennte Bestimmung des freien – primären - Acetons nur als „Screening“ Sinn bei der Routineanwendung.

Weiter ist die Umsetzung des Acetoacetats, wie gezeigt, vom pH-Wert abhängig. Ein höhergradig saurer pH, wie z.B. bei der BGL-Routine-Anwendung, führt, auch ohne die thermische Umsetzung des AcAc im Inkubator, zu einer Decarboxylation von im Schnitt 66%

des in der Probe ursprünglich enthaltenen Acetoacetats. Dies ist zum einen eine fehlende Erfassung von 34% des übrigen Gehaltes, zum anderen u.U. ein Fehler von eben 66%, wenn man gezielt das freie Aceton messen wollte.

Gemessenes Aceton kann prinzipiell – im Rahmen des Ketonkörpermetabolismus- auf 2 verschiedene Arten bezüglich seiner Entstehung interpretiert werden. Zum einen kann Aceton bei abklingender Ketoazidose nur mehr Stoffwechselprodukt des Abbaus der eigentlich physiologisch aktiven Substanzen Acetoacetat und Beta-Hydroxybutyrat sein, zum anderen Abbauprodukt eben dieser Substanzen im Rahmen einer akuten Entgleisung oder hohen Beanspruchung des Fettstoffwechsels. Insofern ist mit einer einzigen Ausnahme in der Regel nicht davon auszugehen, dass gemessenes Aceton nicht aus Acetoacetat entstanden ist. Auch bei ausführlicher Suche in der Literatur findet sich hier kein weiterer Anhaltspunkt außer der genannten Ausnahme, der Aufnahme von Isopropanol (2-Propanol). Die beschriebenen Fälle und Studien beziehen sich ausschließlich auf zwei Aspekte: Zum einen auf die teils akzidentelle, teils willentliche Aufnahme von Isopropanol durch Alkoholabhängige, zum anderen die Aufnahme über die Haut bei Kleinkindern und Säuglingen im Rahmen von Desinfektions- oder Therapiemaßnahmen, wie etwa Wadenwickel (Bougneres et al., 1995; Christ et al., 1987; Church and Witting, 1997; Daniel et al., 1981; Ghittori et al., 1996; Jones and Summers, 2000; Kalapos, 2003; Memon et al., 1992; Mydler et al., 1993; Petkovits et al., 1989; Rieth et al., 2002; Trullas et al., 2004; Van de Graaff and Thompson, 1978; Vivier et al., 1994; Wiernikowski et al., 1997; Zaman et al., 2002). Beide Aspekte sind anamnestisch meist eindeutig identifizierbar. Bei den Messwerten fallen, unter der Voraussetzung einer HSGC-Analyse, erheblich erhöhte Isopropanol-Werte zusammen mit erhöhten Aceton-Werten auf. Der Fall, dass Isopropanol als Alkohol in diesem Fall schon vollständig eliminiert ist, war bei entsprechender Literaturrecherche nicht zu finden, so dass wohl ein isoliert vorliegender hoher Acetonwert die Diagnose einer primären Ketonämie nicht fälschlich stützen kann. Sollten die Spiegel der Messwerte eine zweideutige Aussage liefern, so lässt sich über die Bestimmung von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat schnell die richtige Differentialdiagnose stellen. Natürlich ist der Fall einer kombinierten Ketonämie und Isopropanol-Vergiftung nicht ausschließbar, dies ist aber bislang nicht in der Literatur beschrieben. Schlussfolgerung bleibt im Wesentlichen, dass Aceton in der Regel aus Acetoacetat entsteht und die HS-GC-Messung nach dem Acetoacetat-Verfahren einen Aceton-Wert liefert, der sich gänzlich aus der Entstehung des Acetons aus Acetoacetat erklärt. Eine Differenzierung zwischen freiem Aceton und Acetoacetat ist daher nur selten sinnvoll

β -Hydroxybutyrat

Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit der Herstellung einer Eichlösung erwies sich die Messung von β -Hydroxybutyrat als ausreichend genau. Die fehlerhafte Eichlösung war auf die erhebliche Hygroskopität des Natrium-Salzes von β -Hydroxybutyrat zurückzuführen, mit dem zunächst die Eichlösungen hergestellt wurden. Nach Messung einer Kalibrationslösung und entsprechenden Verdünnungsreihen ergab sich, dass die Messung mittels des beschriebenen Ansatzes eine sehr gute Genauigkeit aufwies. Dies gilt natürlich nur, wenn sicher gestellt ist, dass die verwendeten Lösungen nicht „verfallen“ sind, d.h. die Substrate und Enzyme frisch sind. Für forensische Zwecke ist daher zu fordern, dass in jeder Messreihe eine Kalibrationslösung mitläuft, über die sichergestellt werden kann, dass sowohl die enzymatischen und thermischen Schritte, als auch die gaschromatographische Messung korrekt funktionieren.

Betrachtet man die bislang in der Literatur diskutierten Werte, die alle, z.T. sogar erheblich über 1 mmol liegen (Brinkmann et al., 1998; Iten and Meier, 2000; Pounder et al., 1998), die gefordert werden um Ketonkörper in die Todesursachenbetrachtung miteinzuschließen, so kann festgestellt werden, dass eine Standardabweichung bei Doppelbestimmungen von 9,3 mg/l hinreichend präzise ist, da dies gerade 0,090 mmol/l Standardabweichung entspricht. Auch hier ist die Verwendung von HSGC mit dem Vorteil verknüpft, die Plausibilität des Messergebnisses einfach und schnell durch optische Überprüfung des Chromatogrammes einordnen zu können.

Da β -Hydroxybutyrat als relativ stabile Substanz anzusehen ist, was eigene Messungen und eine Arbeit von Fritzsche (Fritzsche et al., 2001) deutlich belegen und sich die Haltbarkeit relativ unabhängig von der „Trägerlösung“, wie z.B. Vollblut, Serum, Liquor gezeigt hat, ergibt sich, dass die Substanz für postmortale Diagnostik hervorragend geeignet ist. Selbst unter ungünstigen Bedingungen würde man – eine Degradation z.B. durch bakterielle β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen unterstellt – immer noch Aceton als Endprodukt nachweisen können. Die weitere Bewertung von gemessenem β -Hydroxybutyrat ist dann ohnehin unter den ergänzenden Aspekten der Aceton/Acetoacetat-Messung (s.o.) zu sehen.

Grenzwerte

Idealerweise wäre die Definition von Grenzwerten sinnvoll, bei deren Überschreitung die Diagnose „Ketoazidose“ als Todesursache sicher ist. Wenngleich in der Literatur hierfür Vorschläge gemacht werden (Brinkmann et al., 1998; Iten and Meier, 2000; Pounder et al., 1998), ergeben die eigenen Messwerte vielmehr, dass es sinnvoll erscheint, einen unteren Grenzwert zu definieren, ab dem es möglich erscheint, dass die Erhöhung der Ketonkörper eine maßgebliche Rolle spielt. Bei Überschreiten dieses Wertes wäre dann die Gesamtbefundkonstellation mit einzubeziehen, um konkurrierende oder begleitende

Todesursachen zu berücksichtigen. Die Argumentation hierfür ergibt sich, da auch Werte beobachtet werden, die massiv erhöht scheinen, aber autoptisch eine eindeutige andere Todesursache festgestellt wurde. Auch bei intakten Kompensationsmechanismen sonst „stoffwechselgesunder“ Individuen erscheinen deutlich höhere Werte möglich, als sie bislang als Grenzwerte für eine todesursächliche Betrachtung diskutiert werden. Führt man sich hier vor Augen, dass der menschliche Körper Phasen längerer Nahrungsentzugs problemlos bei entsprechender Adaptionszeit überstehen kann, so erscheint es logisch, dass Grunderkrankung und zeitlicher Verlauf bei der Entstehung einer Ketoazidose in die Beurteilung mit einfließen müssen. Daraus entstünden dann für unterschiedliche Entitäten differenzierte Werte. Diese hier festzulegen oder vorzuschlagen wäre vermessen, da hierzu gezielte Untersuchungen von ausreichend großen Fallgruppen erforderlich wären. Dies stellt aber teilweise ein erhebliches Problem dar, da z.B. im Obduktionsgut des Instituts eindeutige Fälle von Verhungern bei grober Schätzung ca. einmal im Jahr vorkommen. Zu selten für verlässliche Aussagen. Bei Alkoholikern ergeben sich zwar ausreichende Fallzahlen, allerdings entsteht hier das Problem der teilweise erheblichen Begleiterkrankungen. Trotzdem erscheint es sinnvoll, bei pathomorphologischen Befunden, die eine Alkoholerkrankung belegen, den Werten in der Literatur zu folgen und 2,5 mmol/l BOHB bzw. 10 mmol Ketonkörpersumme als Grenzwert für eine todesursächliche Ketoazidose anzusehen. Dies heißt nicht, dass darunter keine ketoazidotisch bedingten Todesfälle vorliegen können, sondern vielmehr, dass hier eine hinreichende Aussagesicherheit erreicht wird.

„Precision Xtra“

Der elektrochemische Schnelltest, ähnlich aufgebaut wie gängige Glucosemessgeräte, erwies sich in der rechtsmedizinischen Routine als zuverlässig und gut einsetzbar. Bei hinreichender Genauigkeit ergab sich im Wesentlichen nur die Einschränkung, dass eingedicktes Blut bei Leichen mit längerer Liegezeit oft keine Messwerte mehr lieferte, da offensichtlich kein Plasma mehr durch den integrierten Filter zum Messort auf dem Teststreifen gelangen konnte. Gleichwohl waren Messungen am Liquor in solchen Fällen in aller Regel möglich, was die These, dass eingedicktes Blut den Filter „verstopft“ sehr plausibel erscheinen lässt. Würde man die Messungen am Liquor noch einer entsprechenden Evaluierung mit Gewinnung von evtl. Korrekturfaktoren unterziehen, so ergäbe sich für diesen Test eine vergleichsweise lange Anwendbarkeit bezogen auf die Liegezeit. Insgesamt stellt er eine sehr sinnvolle Ergänzung der Vortests bei der Obduktion dar, mit Vorteilen gegenüber Urinstreifentests. Diese sind die Messbarkeit von BOHB und die Anwendbarkeit am Blut. Gleichzeitig lieferte die Anwendung des Gerätes den positiven Nebenaspekt einer sofort verfügbaren Glucosemessung, die schon am Obduktionstisch

richtungsweisende Ergebnisse für die weitere Bearbeitung und Beurteilung des Falles haben kann. Gleichwohl waren die Messtreifen für Glucose mit den gleichen Beschränkungen, aber auch Vorteilen wie die BOHB-Teststreifen behaftet.

Praxis

Hiermit kristallisiert sich auch deutlich heraus, wo die zentrale Problematik derartiger Stoffwechselstörungen im rechtsmedizinischen Untersuchungsgut liegt. Die Differentialdiagnose Ketoazidose, gleich welchen Untertyps, wird nur selten hinreichend abgeklärt. Dabei ist zu beachten, dass die semiquantitativen Schnelltests für den Urin, basierend auf einer im alkalischen Milieu ablaufenden Nitroprussidreaktion, β -Hydroxybutyrat nicht erfassen können, sondern nur Acetoacetat. Eine Lösung von β -Hydroxybutyrat in Wasser ergibt selbst bei höchsten Konzentrationen keinerlei positive Reaktion. Folge ist, dass die notwendigen weiteren Untersuchungen nur selten in die Wege geleitet werden. Somit verbleibt als Anlass für weitere Untersuchungen häufig nur die Vorgeschichte. Ist eine solche spezifischer Art nicht vorhanden, unterbleibt häufig eine Abklärung.

Dennoch sollte die hier beschriebene Diagnostik bei Verdachtsmomenten auf Zuckerstoffwechsellentgleisungen immer zur Anwendung kommen. Des Weiteren kann sie wertvolle Hinweise auf die Überlebenszeit liefern. Dies ist unter praktischen Aspekten eine derart häufige Fragestellung, – z.B. hinsichtlich der Rettbarkeit oder bei unterlassener Hilfeleistung - dass die Untersuchung hier zwingend angezeigt scheint.

Hypothermie

Bei der todesursächlichen Einwirkung kalter Umgebungstemperaturen erscheint es sinnvoll zwischen Erfrieren und Unterkühlung zu unterscheiden. Erfrieren erscheint eher im Licht einer akuten, oder sogar perakuten Hypothermie, während Unterkühlung als prolongierte Hypothermie anzusehen ist. Die Begründung für diese Unterscheidung liegt in den damit assoziierten Ketonkörpernspiegeln. Schnelles Erfrieren erzeugt keine relevanten Spiegel, prolongierte Glucagon- und Katecholaminausschüttung – Unterkühlung - dagegen signifikant erhöhte Spiegel. Die Erfahrungen zeigen, dass auch hier vor allem die vitale Liegezeit die wesentliche Rolle zu spielen scheint. Aktuell sind hier Opfer einer perakuten Unterkühlung zu nennen, die im Schnelltest keine relevante Ketonkörpererhöhung zeigten, wiewohl die Todesursache „Erfrieren“ bzw. der Komplikation Herzrhythmusstörung bei einem der Opfer aufgrund der Diagnostik während notärztlicher Behandlung als belegt gelten kann. Inwiefern die „klassischen“ makroskopischen Zeichen einer Hypothermie, wie gerötete Gelenke, Wischnewski-Flecken und Psoas-Einblutungen hier mit hineinspielen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es entstand jedoch der Eindruck, dass zumindest Psoas-

Einblutungen und Wischnewski-Flecken mit längeren Zeitverläufen einhergehen, wie auch erhöhte Ketonkörperpiegel.

Bei fäulnisverändertem Probenmaterial, bei im Raum stehender Ketoazidose aufgrund der Begleitumstände relativ häufig, erwies sich die Methode als gut anwendbar. Bei entsprechender Aufarbeitung der Proben, d.h. Gewinnung einer wässrigen Phase aus dem mit Geweberesten, freigesetzten Fetten durchsetzten, hämolytischen Blut, ergaben sich keine Einschränkungen. Die enzymatische Umsetzung funktionierte, es konnten differenzierte Werte für BOHB und die Summe aus Acetoacetat und Aceton erhoben werden. Bei längeren Liegezeiten macht es kaum Sinn auch nur im Ansatz zu versuchen, freies Aceton getrennt zu bestimmen, da die Decarboxylierung des Acetoacetats über die Zeit ohnehin zu einer Art unkontrolliertem Vorgriff der Aufbereitung geführt hat. Für die Diagnose der wesentlichen Krankheitsbilder erscheint dies auch nicht relevant.

Ausblick

Die Messung von Ketonkörpern ist in der rechtsmedizinischen Routine nicht zu ersetzen, auffällige Werte mit erheblicher Bedeutung für die Bewertung eines Falles kommen regelmäßig vor. Dies galt bislang vor allem für Alkoholranke und schlecht eingestellte Diabetiker. Die Entwicklung der modernen Diabetestherapie mit kontinuierlicher subkutaner Insulinapplikation, zeigt jedoch ein höheres Risiko für Ketoazidosen (Egger M, 1997), wodurch auch die Anzahl der Fälle steigen wird, bei denen die Rechtsmedizin mit einer derartigen Fragestellung konfrontiert ist.

5. Zusammenfassung

Ketonkörper spielen in der Rechtsmedizin eine wesentliche Rolle bei der Diagnostik von diabetischen Stoffwechsellagen, alkoholassozierten Erkrankungen, Nahrungskarenz unterschiedlicher Genese und Unterkühlen/Erfrieren. Insbesondere die alkoholische und diabetische Ketoazidose, Verhungern, längere Liegezeiten, wie etwa bei Unterkühlungen und chronische und akute Pankreaserkrankungen sind relevant.

Die Diagnostik ist zunächst mit analytischen Problemen behaftet, da in der Regel nur ein semiquantitativer Streifentest am Urin im Rahmen der Obduktion zur Anwendung kommt. Ein positiver Nachweis von Acetoacetat bzw. Aceton im Urin kann aufgrund der Limitationen des Streifentests nur ein grober Hinweis für eine Störung des Ketonkörperstoffwechsels sein. Weitere Hinweise für eine derartige Stoffwechsellage liefert eine „head-space“ - gaschromatographische Begleitstoffuntersuchung des Blutes, in der ein erhöhter Acetonspiegel festgestellt werden kann. Bei entsprechenden Konzentrationen fiel ein erhöhter Acetonwert schon in der routinemäßigen gaschromatographischen Blutalkoholbestimmung auf. Hieraus ergab sich das Ziel, eine forensisch anwendbare Nachweismethode zu entwickeln, insbesondere auch mit der Möglichkeit einer Differenzierung der Ketonkörper.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher in Anlehnung an ein von Felby beschriebenes Verfahren eine Methode zur differentiellen Messung der drei relevanten Ketonkörper entwickelt. Dieses Verfahren wurde an realen Fällen auf seine praktische Anwendbarkeit hin überprüft. Gleichzeitig wurde ein elektrochemisches Verfahren zur Messung von beta-Hydroxybutyrat als „Bed-Side-Test“ praktisch evaluiert, eine mögliche Verbesserung und Erweiterung des bislang verwendeten Urin-Schnelltests.

Die Auswertung führte zu folgenden Ergebnissen und Schlussfolgerungen:

1. Die differenzierte Messung aller 3 Ketonkörper durch Head-Space-Gaschromatographie ist mit hoher Präzision und Sensitivität möglich, die Messung bzw. Interpretation unterliegt aber gewissen Einschränkungen. Diese beruhen auf der thermischen Instabilität von Acetoacetat, das dann als Aceton gemessen wird. Diese Verfälschung, ist aber bei Kenntnis der Stoffwechsellage i.d.R. dadurch zu kompensieren, dass man die Summe von freiem Aceton und Acetoacetat als einen Parameter interpretiert.

2. Die Methode lässt sich durch entsprechende Vorbereitung gut in den Routinebetrieb eingliedern. Einziges wesentliches Problem ist die Haltbarkeit der verwendeten Substrate, die eine regelmäßige Erneuerung erfordern.
3. Beta-Hydroxybutyrat ist eine mit diesem Verfahren sehr gut messbare und stabile Substanz, die selbst bei fäulnisverändertem Untersuchungsgut noch verwertbare Ergebnisse liefert. Dies ist von erheblicher Bedeutung in der rechtsmedizinischen Routine.
4. Die untersuchten Beispielfälle belegen die Möglichkeit, diabetische Stoffwechsellstörungen auch im rechtsmedizinischen Untersuchungsgut mit dem beschriebenen Verfahren gut und differenziert zu erfassen. Eine gänzlich sichere Unterscheidung zwischen diabetischer und alkoholischer Ketoazidose ergibt sich jedoch nicht aus den Untersuchungen allein, sondern aus der – zwingenden – Gesamtbetrachtung aller Befunde. Für forensische Fragestellungen im Zusammenhang mit diabetischen Stoffwechsellstörungen sollte die differenzierte Messung der Ketonkörper immer durchgeführt werden.
5. Das Gerät „Precision Xtra“ stellt mit geringen Einschränkungen durch die Messung von Glucose und beta-Hydroxybutyrat eine sehr gut praktikable, rasche und aussagekräftige Ergänzung einer Obduktion dar. Das Gerät liefert hinreichend genaue Messwerte. Eindeutige Fehlmessungen konnten nicht beobachtet werden, allerdings liefert das Gerät bei ungeeignetem Blut keine Messwerte mehr. Eine Anwendung an anderen Körperflüssigkeiten ist möglich, bedarf aber der genauen Evaluation.
6. Die untersuchten Fälle lassen die Vermutung zu, dass hohe Ketonkörperspiegel bei sonst stoffwechselgesunden Personen vor allem mit der Liegezeit unter Nahrungskarenz und dem Einfluss von Stresshormonen verbunden sind. Kurzfristige Vorgänge liefern hierfür in aller Regel keine plausible Erklärung. Hinweise auf die Liegezeit sind von hochgradigem rechtsmedizinischem Interesse, da damit eine Vielzahl juristischer Fragestellungen, z.B. die Rettbarkeit, verknüpft sind.
7. Die untersuchten Entzugsverläufe bei Alkoholikern zeigen meist zunehmend erhöhte Ketonkörperspiegel. Diese erreichen teilweise sehr hohe Werte, so dass eine Überwachung bei Entzugspatienten zu diskutieren ist. Gleichzeitig erlaubt das Verfahren die Feststellung, ob andere Substanzen, etwa Isopropanol, eine Rolle spielen.
8. Alkoholische Ketoazidosen weisen in der Regel deutlich höhere BOHB-Werte auf als andere Stoffwechsellstörungen, etwa Unterkühlungsfälle oder isolierte Nahrungskarenz. Dies stimmt gut mit der Annahme eines alkoholbedingten NADH-Überschusses in der Literatur (Iten and Meier, 2000) überein. Die differenzierte

Messung der Ketonkörper kann unter bestimmten Voraussetzungen hier ein entscheidendes diagnostisches Kriterium sein.

6. Literaturverzeichnis

2005. Hypothermia-related deaths--United States, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54:173-175.
2006. Hypothermia-related deaths--United States, 1999-2002 and 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55:282-284.
- Akinola AB, Smith GD, Mathias CJ, Land J, Watson L, Puvirajasingham S, Magnifico F. 2001. The metabolic, catecholamine and cardiovascular effects of exercise in human sympathetic denervation. *Clin.Auton.Res.* 11:251-257.
- American Diabetes A. 1992. Urine glucose and ketone determinations (position statement). *Diabetes Care* 15:38-45.
- Ballasse EO. 1979. Kinetics of ketone body metabolism in fasting humans. *Metabolism* 28:41-50.
- Bougneres PF, Rocchiccioli F, Nurjhan N, Zeller J. 1995. Stable isotope determination of plasma lactate conversion into glucose in fasting infants. *Am.J.Physiol* 268:E652-E659.
- Brinkmann B, Fechner G, Karger B, DuChesne A. 1998. Ketoacidosis and lactic acidosis--frequent causes of death in chronic alcoholics? *Int.J.Legal.Med.* 111:115-119.
- Cahill GF, Jr. 1981. Ketosis. *Kidney Int.* 20:416-425.
- Caspar CB, Risti B, Iten PX, Jost R, Russi EW, Speich R. 1993. [Alcoholic ketoacidosis]. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 123:1929-1934.
- Chansky ME, Lubkin CL, Tintinalli JE, Kelen GD. 1999. Diabetic Ketoacidosis. In: *Emergency medicine: McGraw-Hill.* p 1330-1337.
- Christ B, Lohne R, Schmidt H, Jungermann K. 1987. Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase by adenosine, but not ketone bodies or ammonia in rat hepatocyte cultures. Possible significance for the zonal heterogeneity of liver parenchyma. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 368:1579-1587.
- Church AS, Witting MD. 1997. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J Emerg Med* 15:687-692.
- Clutter WE, Bier DM, Shah SD, Cryer PE. 1980. Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man. *J.Clin.Invest* 66:94-101.
- Csako G, Elin RJ. 1996. Spurious ketonuria due to captopril and other free sulfhydryl drugs. *Diabetes Care* 19:673-674.
- Custer EM, Myers JL, Poffenbarger PL, Schoen I. 1983. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma, and whole blood. *Am.J.Clin.Pathol.* 80:375-380.
- Daniel DR, McAnalley BH, Garriott JC. 1981. Isopropyl alcohol metabolism after acute intoxication in humans. *J Anal Toxicol* 5:110-112.
- Dillon ES, Dyer WW, Smelo LS. 1940. Ketone acidosis in non-diabetic adults. *Med.Clin.North Am.* 24:1813-1822.
- Egger M DSG, Stettler C, Diem P. 1997. Risk of adverse effects of intensified treatment in insulin-dependent diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabet Med* 14:919-928.
- Felby S, Nielsen E. 1994. Determination of ketone bodies in postmortem blood by head-space gas chromatography. *Forensic Sci Int* 64:83-88.
- Fery F, Balasse EO. 1983. Ketone body turnover during and after exercise in overnight-fasted and starved humans. *Am.J.Physiol* 245:E318-E325.
- Fery F, Balasse EO. 1985. Ketone body production and disposal in diabetic ketosis. A comparison with fasting ketosis. *Diabetes* 34:326-332.
- Fery F, Balasse EO. 1994. Glucose metabolism during the starved-to-fed transition in obese patients with NIDDM. *Diabetes* 43:1418-1425.
- Fery F, d'Attellis NP, Balasse EO. 1990. Mechanisms of starvation diabetes: a study with double tracer and indirect calorimetry. *Am.J.Physiol* 259:E770-E777.
- Feuerlein W. 1998. Alkoholismus. Mißbrauch und Abhängigkeit: Entstehung-Folgen:104-123.

- Foster DW, Rubenstein, Fauci BIWMKHL. 1998. Hypoglycemia. In: Harrison's Principles of internal medicine. New York: McGraw Hill. p 2081-2087.
- Fritzsche I, Buhrdel P, Melcher R, Bohme HJ. 2001. Stability of ketone bodies in serum in dependence on storage time and storage temperature. Clin.Lab 47:399-403.
- Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. 2004. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids 70:243-251.
- Fulop M, Bock J, Ben Ezra J, Antony M, Danzig J, Gage JS. 1986. Plasma lactate and 3-hydroxybutyrate levels in patients with acute ethanol intoxication. The American Journal of Medicine 80:191-194.
- Ghittori S, Maestri L, Maraccini P, Imbriani M. 1996. Acetone in urine as biological index of occupational exposure to isopropyl alcohol. Ind.Health 34:409-414.
- Gilg T. 1986. Nachweis von Begleitstoffen in alkoholischen Getränken, Blut und Körperflüssigkeiten und deren Bedeutung. Med.Welt 37:246-248.
- Gilg T. 1992. Methanol: Stoffwechsel bei kurzzeitiger und chronischer Alkoholaufnahme und Stellenwert als biochemischer Alkoholismuskriterium. In: Institut für Rechtsmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München. p 101.
- Gilg T, vMeyer L. 1986. Zur simultanen Bestimmung der Blutalkoholkonzentration bei Begleitstoffanalysen. Medizin und Recht:54-60.
- Glaser N, Barnett P, McCaslin I, Nelson D, Trainor J, Louie J, Kaufman F, Quayle K, Roback M, Malley R, Kuppermann N. 2001. Risk factors for cerebral edema in children with diabetic ketoacidosis. The Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee of the American Academy of Pediatrics. N.Engl.J.Med. 344:264-269.
- Halperin ML, Bear RA, Hannaford MC, Goldstein MB. 1981. Selected aspects of the pathophysiology of metabolic acidosis in diabetes mellitus. Diabetes 30:781-787.
- Harrison J, Hodson AW, Skillen AW, Stappenbeck R, Agius L, Alberti KG. 1988. Blood glucose, lactate, pyruvate, glycerol, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate measurements in man using a centrifugal analyser with a fluorimetric attachment. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 26:141-146.
- Iten PX, Meier M. 2000. Beta-hydroxybutyric acid--an indicator for an alcoholic ketoacidosis as cause of death in deceased alcohol abusers. J.Forensic Sci. 45:624-632.
- Jeukendrup A. 2005. Fettverbrennung und körperliche Aktivität. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 56:337-338.
- Johnson RH, Walton JL, Krebs HA, Williamson DH. 1969. Metabolic fuels during and after severe exercise in athletes and non-athletes. Lancet 2:452-455.
- Jones AE, Summers RL. 2000. Detection of isopropyl alcohol in a patient with diabetic ketoacidosis. J.Emerg.Med. 19:165-168.
- Jones AW. 2000. Elimination half-life of acetone in humans: case reports and review of the literature. J.Anal.Toxicol. 24:8-10.
- Jones AW, Sagarduy A, Ericsson E, Arnqvist HJ. 1993. Concentrations of acetone in venous blood samples from drunk drivers, type-I diabetic outpatients, and healthy blood donors. J.Anal.Toxicol. 17:182-185.
- Kalapos MP. 2003. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. Biochim Biophys Acta 1621:122-139.
- Kernbach-Wighton G. SK-S. 2004. On the postmortem biochemical diagnosis of hypothermia. In: Oehmichen M, editor. Hypothermia. Clinical, Pathological and Forensic Features
Lübeck: Schmidt-Römhild. p 221ff.
- Kitabchi AE, Wall BM. 1995. Diabetic ketoacidosis. Med.Clin.North Am. 79:9-37.
- Kitabchi AE, Wall BM. 1999. Management of diabetic ketoacidosis. Am.Fam.Physician 60:455-464.
- Krebs HA, Wallace PG, Hems R, Freedland RA. 1969. Rates of ketone-body formation in the perfused rat liver. Biochem.J. 112:595-600.
- Laboratories AM. 2000. Precision Xtra. In: Produktbeschreibung und Bedienungsanleitung.
- Laffel L. 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Metab Res.Rev. 15:412-426.

- Lebovitz HE. 1995. Diabetic ketoacidosis. *Lancet* 345:767-772.
- Malone ML, Gennis V, Goodwin JS. 1992. Characteristics of diabetic ketoacidosis in older versus younger adults. *J Am Geriatr Soc* 40(11):1100.
- McGarry JD, Foster DW. 1972. Regulation of ketogenesis and clinical aspects of the ketotic state. *Metabolism* 21:471-489.
- McGarry JD, Foster DW. 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu.Rev.Biochem.* 49:395-420.:395-420.
- Memon RA, Feingold KR, Moser AH, Doerrler W, Grunfeld C. 1992. In vivo effects of interferon-alpha and interferon-gamma on lipolysis and ketogenesis. *Endocrinology* 131:1695-1702.
- Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, Lambert M, Lapierre P, Potier E. 1995. Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin.Invest Med.* 18:193-216.
- Mydler TT, Wasserman GS, Watson WA, Knapp JF. 1993. Two-week-old infant with isopropanol intoxication. *Pediatr Emerg Care* 9:146-148.
- Nicolaou DD, Kelen GD, Tintinalli JE, Kelen GD. 1999. Acid-base disorders. In: *Emergency medicine: McGraw-Hill.* p 129-140.
- Olpin SE. 2004. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 70:293-308.
- Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF, Jr. 1969. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J.Clin.Invest* 48:574-583.
- Owen OE, Reichard GA, Jr., Patel MS, Boden G. 1979. Energy metabolism in feasting and fasting. *Adv.Exp.Med.Biol.* 111:169-88.:169-188.
- Petkovits T, Bohn G, Brinkmann B. 1989. [Forensic medicine and toxicologic aspects of 2-propanol poisoning]. *Z Rechtsmed* 102:69-75.
- Pounder DJ, Stevenson RJ, Taylor KK. 1998. Alcoholic ketoacidosis at autopsy. *J.Forensic Sci.* 43:812-816.
- Quant PA. 1994. The role of mitochondrial HMG-CoA synthase in regulation of ketogenesis. *Essays Biochem.* 28:13-25.:13-25.
- Reichard GA, Jr., Haff AC, Skutches CL, Paul P, Holroyde CP, Owen OE. 1979. Plasma acetone metabolism in the fasting human. *J.Clin.Invest* 63:619-626.
- Rezvani AH, Alcohols and E. 1992. Ethel Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents. In: Thurman RG, Kauffman FC, editors. Amsterdam;New York: Elsevier. p 31-37.
- Rieth LR, Moore DR, Lobkovsky EB, Coates GW. 2002. Single-site beta-diiminate zinc catalysts for the ring-opening polymerization of beta-butyrolactone and beta-valerolactone to poly(3-hydroxyalkanoates). *J.Am.Chem.Soc.* 124:15239-15248.
- Skoog D, Leary J. 1996. Principles of instrumental analysis, 4 ed. Berlin: Springer.
- Teresinski G, Buszewicz G, Madro R. 2002. The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia. *Forensic Sci.Int.* 127:88-96.
- Teresinski G, Buszewicz G, Madro R. 2005. Biochemical background of ethanol-induced cold susceptibility. *Leg Med (Tokyo)* 7:15-23.
- Thomas L, Thomas L. 1998. Ketonkörper. In: *Labor und Diagnose.* Frankfurt/Main: TH.Books-Verlagsgesellschaft. p 158-164.
- Thompson CJ, Johnston DG, Baylis PH, Anderson J. 1986. Alcoholic ketoacidosis: an underdiagnosed condition ? *Br.Med.J.* 292:463-465.
- Thomsen JL, Felby S, Theilade P, Nielsen E. 1995. Alcoholic ketoacidosis as a cause of death in forensic cases. *Forensic Sci.Int.* 75:163-171.
- Thomsen JL, Felby S, Theilade P, Nielsen E. 2000. [Alcoholic ketoacidosis]. *Ugeskr.Laeger* 162:1859-1861.
- Trullas JC, Aguilo S, Castro P, Nogue S. 2004. Life-threatening isopropyl alcohol intoxication: is hemodialysis really necessary? *Vet Hum Toxicol* 46:282-284.
- Van de Graaff WB, Thompson WL. 1978. Isopropyl alcohol intoxication. *Arch Intern Med* 138:826.

- Vivier PM, Lewander WJ, Martin HF, Linakis JG. 1994. Isopropyl alcohol intoxication in a neonate through chronic dermal exposure: a complication of a culturally-based umbilical care practice. *Pediatr Emerg Care* 10:91-93.
- Wiernikowski A, Piekoszewski W, Krzyzanowska-Kierepka E, Gomulka E. 1997. [Acute oral poisoning with isopropyl alcohol in alcoholics]. *Przegl.Lek.* 54:459-463.
- Williamson DH. 1981. Mechanisms for the regulation of ketogenesis. *Proc.Nutr.Soc.* 40:93-98.
- Wittmann S, Gilg T, Dietz HG, Grantzow R, Peschel O, von Meyer L. 1992. [Isopropanol and acetone level in serum after preoperative surface disinfection with antiseptics containing isopropanol]. *Blutalkohol* 29:326-335.
- Zaman F, Pervez A, Abreo K. 2002. Isopropyl alcohol intoxication: a diagnostic challenge. *Am J Kidney Dis* 40:E12.

7. Tabellen

Precision Xtra Messwerte						
	Teststreifen	HS-GC	Photometer		Diagnose	Nebenbefund
Fall	BOHB mmol/l	BOHB mmol/l	BOHB mmol/l	Ethanol %o		
00/482	3	-	3,08	0,00	C2	21,7 mg/l GHB
00/563	1,4	-	1,45	0,30	C2 ?/Kreislaufversagen	
01/166	h	-	7,02	0,00	?	
01/199	h	-	12,3	0,75	C2	
01/697	3	-	3	0,04	C2	
01/717	1,4	-	1,42	0,58	C2	
01/748	6	-	6,75	0,00	C2	
01/818	0,8	-	0,75	0,00	Epi-Anfall	
02/254	h	-	10,5	0,00	Hypothermie,Lactat	4,5 mmol/l Aceton
02/362	4,5	-	4,63	0,16	Fäulnis	
02/532	1,1	-	1,12	0,00	C2	TU Pankreatitis
02/762	1,9	-	2,02	0,00	Addison-Krise	
03/456	0,0	-	0,04	0,93	C2	Fettleber
03/212	0,1	-	0,11	0,20	?	
00/312	0,1	-	0,12	0,12	V.a. HRST	BMI 16

	Teststreifen	HS-GC
Liegezeit [d]	BOHB mmol/l	BOHB mmol/l
1	1,50	1,57
2	1,40	1,52
3	1,50	1,49
4	1,30	1,50
5	Error	1,53
6	Error	1,57
7	Error	1,41
8	Error	1,46
9	Error	1,43
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-

	Teststreifen	HS-GC
Liegezeit [d]	BOHB mmol/l	BOHB mmol/l
1	0,80	0,90
2	0,80	0,82
3	Error	0,79
4	Error	0,83
5	Error	0,79
6	Error	0,81
7	Error	0,84
8	Error	0,75
9	Error	0,78
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-

	Probe 0,25ml	Material	Methode	Ergebnis	Aceton	AcAc	AcAc	BOHB	BOHB	BOHB/AC	AcAc+BOH	Σ-
				Aceton	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	KBR	+ACAC	B
1	FN-1	Serum Aufnahme	Aceton	17,3	0,298							
	FN-1	Serum Aufnahme	AcAc	18,0	0,310	1,2	0,01					
	FN-1	Serum Aufnahme	BOHB	28,0	0,482			17,8	0,17	14,3	14,6	0,185
					0,000							
2	FN-2	Serum 0 Promille	Aceton	23,5	0,405							
	FN-2	Serum 0 Promille	AcAc	26,9	0,463	5,9	0,06					
	FN-2	Serum 0 Promille	BOHB	33,0	0,568			10,9	0,11	1,8	2,2	0,164
3	FN-3	Serum 0+4h	Aceton	76,4	1,315							
	FN-3	Serum 0+4h	AcAc	91,9	1,582	27,0	0,27					
	FN-3	Serum 0+4h	BOHB	152,7	2,629			108,2	1,05	3,9	5,2	1,317
4	SM-1	Serum Aufnahme	Aceton	41,2	0,709							
	SM-1	Serum Aufnahme	AcAc	54,2	0,932	22,5	0,22					
	SM-1	Serum Aufnahme	BOHB	131,0	2,256			136,8	1,33	6,0	6,7	1,550
5	SM-2	Serum 0 Promille	Aceton	38,5	0,663							
	SM-2	Serum 0 Promille	AcAc	48,5	0,835	17,4	0,17					
	SM-2	Serum 0 Promille	BOHB	69,1	1,190			36,7	0,36	2,1	2,7	0,528
6	SM-3	Serum 0+4h	Aceton	10,3	0,177							
	SM-3	Serum 0+4h	AcAc	11,9	0,205	2,8	0,03					
	SM-3	Serum 0+4h	BOHB	14,4	0,248			4,5	0,04	1,5	1,7	0,071
7	WV-1	Serum Aufnahme	Aceton	12,6	0,217							
	WV-1	Serum Aufnahme	AcAc	16,2	0,279	6,3	0,06					
	WV-1	Serum Aufnahme	BOHB	20,3	0,350			7,3	0,07	1,1	1,4	0,133
8	WV-2	Serum 0 Promille	Aceton	38,8	0,668							
	WV-2	Serum 0 Promille	AcAc	42,4	0,730	6,3	0,06					
	WV-2	Serum 0 Promille	BOHB	45,5	0,783			5,5	0,05	0,9	1,5	0,116
9	WV-3	Serum 0+4h	Aceton	28,7	0,494							
	WV-3	Serum 0+4h	AcAc	30,7	0,529	3,6	0,04					
	WV-3	Serum 0+4h	BOHB	64,6	1,112			60,3	0,58	16,5	17,0	0,620

7. Tabellen

10	PK-1	Serum Aufnahme	Aceton	11,3	0,195								
	PK-1	Serum Aufnahme	AcAc	12,9	0,222	2,8	0,03						
	PK-1	Serum Aufnahme	BOHB	23,0	0,396			18,0	0,17	6,3	6,5	0,202	0,396
11	PK-2	Serum 0 Promille	Aceton	18,9	0,325								
	PK-2	Serum 0 Promille	AcAc	19,6	0,337	1,2	0,01						
	PK-2	Serum 0 Promille	BOHB	31,0	0,534			20,3	0,20	16,3	16,7	0,209	0,534
12	PK-3	Serum 0+4h	Aceton	41,8	0,720								
	PK-3	Serum 0+4h	AcAc	55,8	0,961	24,4	0,24						
	PK-3	Serum 0+4h	BOHB	95,6	1,646			70,8	0,69	2,9	3,6	0,928	1,646
13	JS-1	Serum Aufnahme	Aceton	9,7	0,167								
	JS-1	Serum Aufnahme	AcAc	11,9	0,205	3,8	0,04						
	JS-1	Serum Aufnahme	BOHB	10,1	0,174			-3,2	-0,03	-0,8	-0,7	0,007	0,174
14	JS-2	Serum 0 Promille	Aceton	51,5	0,887								
	JS-2	Serum 0 Promille	AcAc	70,4	1,212	32,9	0,33						
	JS-2	Serum 0 Promille	BOHB	76,0	1,309			10,0	0,10	0,3	1,2	0,422	1,309
15	JS-3	Serum 0+4h	Aceton	32,8	0,565								
	JS-3	Serum 0+4h	AcAc	40,0	0,689	12,5	0,12						
	JS-3	Serum 0+4h	BOHB	51,7	0,890			20,8	0,20	1,6	2,2	0,326	0,890
16	WA-1	Serum Aufnahme	Aceton	43,5	0,749								
	WA-1	Serum Aufnahme	AcAc	44,0	0,758	0,9	0,01						
	WA-1	Serum Aufnahme	BOHB	61,3	1,055			30,8	0,30	34,7	35,4	0,307	1,055
17	WA-2	Serum 0 Promille	Aceton	22,2	0,382								
	WA-2	Serum 0 Promille	AcAc	35,0	0,603	22,3	0,22						
	WA-2	Serum 0 Promille	BOHB	49,1	0,845			25,1	0,24	1,1	1,5	0,464	0,845
18	WA-3	Serum 0+4h	Aceton	9,8	0,169								
	WA-3	Serum 0+4h	AcAc	14,7	0,253	8,5	0,08						
	WA-3	Serum 0+4h	BOHB	15,8	0,272			2,0	0,02	0,2	0,4	0,103	0,272
19	HJ-1	Serum Aufnahme	Aceton	13,1	0,226								
	HJ-1	Serum Aufnahme	AcAc	13,6	0,234	0,9	0,01						
	HJ-1	Serum Aufnahme	BOHB	17,5	0,301			6,9	0,07	7,8	8,0	0,076	0,301

20	HJ-2	Serum 0 Promille	Aceton	30,8	0,530								
	HJ-2	Serum 0 Promille	AcAc	34,4	0,592	6,3	0,06						
	HJ-2	Serum 0 Promille	BOHB	39,4	0,678			8,9	0,09	1,4	1,9	0,148	0,678
21	HJ-3	Serum 0+4h	Aceton	30,4	0,523								
	HJ-3	Serum 0+4h	AcAc	40,9	0,704	18,3	0,18						
	HJ-3	Serum 0+4h	BOHB	95,2	1,639			96,7	0,94	5,2	5,7	1,118	1,639
22	WM-1	Serum Aufnahme	Aceton	6,7	0,115								
	WM-1	Serum Aufnahme	AcAc	6,8	0,117	0,2	0,00						
	WM-1	Serum Aufnahme	BOHB	8,5	0,146			3,0	0,03	17,0	17,2	0,031	0,146
23	WM-2	Serum 0 Promille	Aceton	5,2	0,090								
	WM-2	Serum 0 Promille	AcAc	6,9	0,119	3,0	0,03						
	WM-2	Serum 0 Promille	BOHB	7,1	0,122			0,4	0,00	0,1	0,2	0,033	0,122
24	WM-3	Serum 0+4h	Aceton	5,3	0,091								
	WM-3	Serum 0+4h	AcAc	6,0	0,103	1,2	0,01						
	WM-3	Serum 0+4h	BOHB	6,9	0,119			1,6	0,02	1,3	1,4	0,028	0,119
25	MH-1	Serum Aufnahme	Aceton	11,3	0,195								
	MH-1	Serum Aufnahme	AcAc	13,1	0,226	3,1	0,03						
	MH-1	Serum Aufnahme	BOHB	13,6	0,234			0,9	0,01	0,3	0,5	0,040	0,234
26	MH-2	Serum 0 Promille	Aceton	13,0	0,224								
	MH-2	Serum 0 Promille	AcAc	20,6	0,355	13,2	0,13						
	MH-2	Serum 0 Promille	BOHB	22,7	0,391			3,7	0,04	0,3	0,5	0,167	0,391
27	MH-3	Serum 0+4h	Aceton	10,9	0,188								
	MH-3	Serum 0+4h	AcAc	12,4	0,213	2,6	0,03						
	MH-3	Serum 0+4h	BOHB	14,7	0,253			4,1	0,04	1,5	1,7	0,066	0,253
28	WW-1	Serum Aufnahme	Aceton	112,1	1,930								
	WW-1	Serum Aufnahme	AcAc	144,5	2,488	56,4	0,56						
	WW-1	Serum Aufnahme	BOHB	178,5	3,073			60,5	0,59	1,1	3,0	1,145	3,073
29	WW-2	Serum 0 Promille	Aceton	491,6	8,464								
	WW-2	Serum 0 Promille	AcAc	709,2	12,211	378,6	3,75						
	WW-2	Serum 0 Promille	BOHB	1143,6	19,690			773,2	7,50	2,0	10,5	11,246	19,690

7. Tabellen

30	WW-3	Serum 0+4h	Aceton	560,6	9,652								
	WW-3	Serum 0+4h	AcAc	768,8	13,237	362,3	3,58						
	WW-3	Serum 0+4h	BOHB	821,9	14,151			94,5	0,92	0,3	9,9	4,501	14,151
31	RS-1	Serum Aufnahme	Aceton	17,5	0,301								
	RS-1	Serum Aufnahme	AcAc	24,9	0,429	12,9	0,13						
	RS-1	Serum Aufnahme	BOHB	40,4	0,696			27,6	0,27	2,1	2,4	0,395	0,696
32	RS-2	Serum 0 Promille	Aceton	34,8	0,599								
	RS-2	Serum 0 Promille	AcAc	44,3	0,763	16,5	0,16						
	RS-2	Serum 0 Promille	BOHB	58,3	1,004			24,9	0,24	1,5	2,1	0,405	1,004
33	RS-3	Serum 0+4h	Aceton	120,2	2,070								
	RS-3	Serum 0+4h	AcAc	90,5	1,558	-51,7	-0,51						
	RS-3	Serum 0+4h	BOHB	110,9	1,909			36,3	0,35	-0,7	1,4	-0,159	1,909
34	AR-1	Serum Aufnahme	Aceton	14,4	0,248								
	AR-1	Serum Aufnahme	AcAc	15,2	0,262	1,4	0,01						
	AR-1	Serum Aufnahme	BOHB	15,8	0,272			1,1	0,01	0,8	1,0	0,024	0,272
35	AR-2	Serum 0 Promille	Aceton	41,6	0,716								
	AR-2	Serum 0 Promille	AcAc	56,5	0,973	25,9	0,26						
	AR-2	Serum 0 Promille	BOHB	60,1	1,035			6,4	0,06	0,2	1,0	0,319	1,035
36	AR-3	Serum 0+4h	Aceton	6,0	0,103								
	AR-3	Serum 0+4h	AcAc	7,3	0,126	2,3	0,02						
	AR-3	Serum 0+4h	BOHB	10,1	0,174			5,0	0,05	2,2	2,3	0,071	0,174
37	TM-1	Serum Aufnahme	Aceton	20,3	0,350								
	TM-1	Serum Aufnahme	AcAc	20,6	0,355	0,5	0,01						
	TM-1	Serum Aufnahme	BOHB	21,0	0,362			0,7	0,01	1,3	1,7	0,012	0,362
38	TM-2	Serum 0 Promille	Aceton	273,2	4,704								
	TM-2	Serum 0 Promille	AcAc	340,1	5,856	116,4	1,15						
	TM-2	Serum 0 Promille	BOHB	450,9	7,763			197,2	1,91	1,7	6,4	3,065	7,763
39	TM-3	Serum 0+4h	Aceton	222,2	3,826								
	TM-3	Serum 0+4h	AcAc	298,3	5,136	132,4	1,31						
	TM-3	Serum 0+4h	BOHB	376,1	6,476			138,5	1,34	1,0	4,9	2,653	6,476

40	NP-1	Serum Aufnahme	Aceton	14,8	0,255								
	NP-1	Serum Aufnahme	AcAc	21,0	0,362	10,8	0,11						
	NP-1	Serum Aufnahme	BOHB	27,7	0,477			11,9	0,12	1,1	1,3	0,222	0,477
41	NP-2	Serum 0 Promille	Aceton	5,3	0,091								
	NP-2	Serum 0 Promille	AcAc	9,8	0,169	7,8	0,08						
	NP-2	Serum 0 Promille	BOHB	11,2	0,193			2,5	0,02	0,3	0,4	0,102	0,193
42	NP-3	Serum 0+4h	Aceton	6,4	0,110								
	NP-3	Serum 0+4h	AcAc	10,0	0,172	6,3	0,06						
	NP-3	Serum 0+4h	BOHB	12,1	0,208			3,7	0,04	0,6	0,7	0,098	0,208
43	GH-1	Serum Aufnahme	Aceton	11,0	0,189								
	GH-1	Serum Aufnahme	AcAc	11,4	0,196	0,7	0,01						
	GH-1	Serum Aufnahme	BOHB	12,4	0,213			1,8	0,02	2,5	2,7	0,024	0,213
44	GH-2	Serum 0 Promille	Aceton	12,7	0,219								
	GH-2	Serum 0 Promille	AcAc	11,9	0,205	-1,4	-0,01						
	GH-2	Serum 0 Promille	BOHB	13,5	0,232			2,8	0,03	-2,0	-1,8	0,014	0,232
45	GH-3	Serum 0+4h	Aceton	25,0	0,430								
	GH-3	Serum 0+4h	AcAc	32,7	0,563	13,4	0,13						
	GH-3	Serum 0+4h	BOHB	35,9	0,618			5,7	0,06	0,4	0,8	0,188	0,618
46	GS 1972/99	Herzblut	Aceton	29,23	0,503								
	1972/99,H.M.,w,1901,	Herzblut	AcAc	34,48	0,594	9,1	0,09						
	GS 1972/99	Herzblut	BOHB	182,15	3,136			262,9	2,55	28,2	28,7	2,640	3,136
47	GS 1972/99		Aceton	4,28	0,074								
	GS 1972/99	Glaskörperflüssigkeit	AcAc	5,07	0,087	1,4	0,01						
	GS 1972/99		BOHB	9,04	0,156			7,1	0,07	5,0	5,1	0,082	0,156
48	GS 08/00	Oberschenkelvene	Aceton	17,3	0,298								
	08/00 V.E.,m,1958, bek	Oberschenkelvene	AcAc	19,7	0,339	4,2	0,04						
	GS 08/00	Oberschenkelvene	BOHB	27,9	0,480			14,6	0,14	3,4	3,7	0,183	0,480
49	GS	Oberschenkelvene	Aceton	3,15	0,054								
	GS 62/00 Z.W.,m,1948	Oberschenkelvene	AcAc	3,95	0,068	1,4	0,01						
	GS	Oberschenkelvene	BOHB	10,74	0,185			12,1	0,12	8,5	8,6	0,131	0,185
49	GS	Herzblut	Aceton	4,02	0,069								
	GS 62/00 Z.W.,m,1948	Herzblut	AcAc	5,13	0,088	1,9	0,02						
	GS	Herzblut	BOHB	24,2	0,417			33,9	0,33	17,2	17,3	0,348	0,417

7. Tabellen

50	2024/99	Oberschenkelvene	Aceton	736,49	12,681								
	2024/99	Oberschenkelvene	AcAc	817,14	14,069	140,3	1,39						
	2024/99	Oberschenkelvene	BOHB	978,01	16,839			286,3	2,78	2,0	14,7	4,166	16,839
51	2024/99	Herzblut	Aceton	573,94	9,882								
	2024/99	Herzblut	AcAc	594,93	10,243	36,5	0,36						
	2024/99	Herzblut	BOHB	989,28	17,033			701,9	6,81	18,8	28,7	7,170	17,033
52	633/00	Oberschenkelvene	Aceton	736,49	12,681								
	633/00	Oberschenkelvene	AcAc	817,14	14,069	140,3	1,39						
	633/00	Oberschenkelvene	BOHB	1142,3	19,668			578,8	5,61	4,0	16,7	7,002	19,668
53	469/00	Oberschenkelvene	Aceton	3,15	0,054								
	469/00	Oberschenkelvene	AcAc	3,95	0,068	1,4	0,01						
	469/00	Oberschenkelvene	BOHB	10,74	0,185			12,1	0,12	8,5	8,6	0,131	0,185
54	392/00	Oberschenkelvene	Aceton	4,02	0,069								
	392/00	Oberschenkelvene	AcAc	5,13	0,088	1,9	0,02						
	392/00	Oberschenkelvene	BOHB	24,2	0,417			33,9	0,33	17,2	17,3	0,348	0,417
55	2280/01	Oberschenkelvene	Aceton	203,0	3,495								
	2280/01	Oberschenkelvene	AcAc	411,7	7,088	363,1	3,59						
	2280/01	Oberschenkelvene	BOHB	509,9	8,779			174,8	1,70	0,5	4,0	5,289	8,779
56	2459/01	Oberschenkelvene	Aceton	6,4	0,110								
	2459/01	Oberschenkelvene	AcAc	10,3	0,177	6,9	0,07						
	2459/01	Oberschenkelvene	BOHB	38,6	0,665			50,4	0,49	7,2	7,3	0,556	0,665
57	2440/01	Oberschenkelvene	Aceton	245,9	4,234								
	2440/01	Oberschenkelvene	AcAc	467,9	8,056	386,3	3,82						
	2440/01	Oberschenkelvene	BOHB	703,2	12,107			418,8	4,06	1,1	5,3	7,885	12,107
58	18/02	Oberschenkelvene	Aceton	464,0	7,989								
	18/02	Oberschenkelvene	AcAc	552,1	9,506	153,3	1,52						
	18/02	Oberschenkelvene	BOHB	789,3	13,590			422,2	4,10	2,7	10,7	5,612	13,590
59	450/02	Oberschenkelvene	Aceton	538,0	9,263								
	450/02	Oberschenkelvene	AcAc	784,5	13,507	428,9	4,24						
	450/02	Oberschenkelvene	BOHB	870,4	14,986			152,9	1,48	0,3	9,6	5,727	14,986

60	2158/00	Oberschenkelvene	Aceton	832,0	14,325								
	2158/00	Oberschenkelvene	AcAc	1429,9	24,619	1040,3	10,29						
	2158/00	Oberschenkelvene	BOHB	1830,4	31,515			712,9	6,91	0,7	15,0	17,209	31,515
61	483/01	Oberschenkelvene	Aceton	271,0	4,666								
	483/01	Oberschenkelvene	AcAc	310,6	5,348	68,9	0,68						
	483/01	Oberschenkelvene	BOHB	340,0	5,854			52,3	0,51	0,7	5,4	1,189	5,854
62	390/02	Oberschenkelvene	Aceton	10,2	0,176								
	390/02	Oberschenkelvene	AcAc	15,9	0,274	9,9	0,10						
	390/02	Oberschenkelvene	BOHB	21,0	0,362			9,1	0,09	0,9	1,1	0,186	0,362
63	417/02	Oberschenkelvene	Aceton	115,0	1,980								
	417/02	Oberschenkelvene	AcAc	270,5	4,657	270,6	2,68						
	417/02	Oberschenkelvene	BOHB	321,3	5,532			90,4	0,88	0,3	2,3	3,554	5,532
64	467/02	Oberschenkelvene	Aceton	173,3	2,984								
	467/02	Oberschenkelvene	AcAc	297,6	5,124	216,3	2,14						
	467/02	Oberschenkelvene	BOHB	478,3	8,235			321,6	3,12	1,5	4,4	5,260	8,235
65	1137/02	Oberschenkelvene	Aceton	749,7	12,908								
	1137/02	Oberschenkelvene	AcAc	980,3	16,878	401,2	3,97						
	1137/02	Oberschenkelvene	BOHB	1303,2	22,438			574,8	5,57	1,4	14,3	9,545	22,438
66	668/02	Oberschenkelvene	Aceton	382,0	6,577								
	668/02	Oberschenkelvene	AcAc	450,1	7,750	118,5	1,17						
	668/02	Oberschenkelvene	BOHB	748,2	12,882			530,6	5,15	4,4	11,0	6,319	12,882

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Frau Gudrun Braun für die unermüdliche Unterstützung der gaschromatographischen Untersuchungen, Herrn Prof. Gilg für die Betreuung der Arbeit und Herrn Prof. Eisenmenger, an dessen Institut die Durchführung dieser Arbeit möglich war. Letztenendes gilt mein Dank aber auch den Freunden und Kollegen, die mir Geduld und Motivation entgegenbrachten.

8. Lebenslauf

Florian Tobias Fischer

Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	17. Juni 1974
Geburtsort	München
Eltern	Wolfgang und Elfriede Fischer, geb. Röhl

Ausbildung und Beruf

1995	Abitur, Maria-Theresia-Gymnasium, München
1995-2002	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München, Ärztliche Prüfung am 22. 04. 2002
1996	Rettungssanitäter BRK
2002 - 2003	Arzt im Praktikum
04-06/2002	Anästhesie-Gemeinschaftspraxis Hipp, Hargasser, Mielke, München
07-12/2002	Psychiatrische Klinik Waldhaus Chur, Graubünden, CH
01-08/2003	Institut für Rechtsmedizin Universität Zürich, CH
09/2003	Anästhesie-Gemeinschaftspraxis Hipp, Hargasser, Mielke, München
10/2003	Institut für Rechtsmedizin Universität München
ab 11/2003	Assistenzarzt am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, Vorstand Prof. Dr. W. Eisenmenger
12/2005	Fachkunde Rettungsdienst