

Detektion diabetischer Stoffwechsellentgleisungen
bei forensischen Fragestellungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Cornelius Heß

aus Karlsruhe

Bonn, Oktober 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Musshoff

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Lamprecht

Tag der Promotion: 18.10.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

Hess C, Thomas A, Thevis M, Stratmann B, Quester W, Tschoepe D, Madea B, Musshoff F. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012; 404(6-7):1813-22.

Hess C, Stratmann B, Quester W, Tschoepe D, Madea B, Musshoff F. Clinical and forensic examinations of glycaemic marker methylglyoxal by means of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Legal Med.* 2013;127(2):385-93.

Hess C, Stratmann B, Quester W, Madea B, Musshoff F, Tschoepe D. Clinical and forensic examinations of glycemic marker 1,5-anhydroglucitol by means of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2012 10;222(1-3):132-6.

Hess C, Musshoff F, Madea B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 400(1):33-41.

Musshoff F, Hess C, Madea B. Disorders of glucose metabolism: post mortem analyses in forensic cases--part II. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):171-80. Review

Hess C, Musshoff F, Madea B. Disorders of glucose metabolism-post mortem analyses in forensic cases: part I. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):163-70. Review.

Engelbrecht B, Stratmann B, Hess C, Tschoepe D, Gawlowski T. Impact of Methylglyoxal on GLUT4 Translocation in L6 Myoblasts. *Plos One* 2013; 8(5):e65195

Hess C, Wöllner K, Musshoff F, Madea B. Detection of diabetic metabolism disorders post mortem - forensic case reports of cause on death hyperglycaemia. *Drug Test Anal.* 2013;5(9-10):795-801.

Hess C, Musshoff F, Madea B, Daldrup T. Determination of a hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem. *Drug Test Anal.* 2013;5(9-10):802-7

Andere Veröffentlichungen:

Hess C, Ritke N, Bröcker S, Madea B, Musshoff F. Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by means of liquid chromatography hybrid quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (LC-QTOF-

HRMS) and triple-quadrupole mass spectrometry (LC-QqQ-MS). Anal Bioanal Chem 2013;405(12):4077-88

Kirschbaum KM, Grigoleit L, Hess C, Madea B, Musshoff F. Illegal drugs and delinquency. Forensic Sci Int. 2013; 10;226(1-3):230-4

F. Musshoff, L. Hottmann, C. Hess, B. Madea. „Legal Highs“ aus dem deutschen Internet – Der Vormarsch von „Badesalz-Drogen“. Accepted in Arch Krim.

Fachvorträge und Poster:

Simultaneous quantification of human insulin and its synthetic analogues in human plasma by immunopurification and liquid chromatography mass spectrometry; TIAFT Meeting 2010 in Bonn (Poster).

Simultaneous quantification of 15 oral antidiabetics in human plasma by means of liquid chromatography tandem mass spectrometry; TIAFT Meeting 2010 in Bonn (Vortrag).

Das molare Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid: Bestimmung mittels immunchemischer Aufreinigung und anschließender Flüssigkeitschromatographisch / massenspektrometrischer Bestimmung; Jahrestagung Rechtsmedizin 2010 in Berlin (Vortrag).

Anhydroglucitol - a new marker for antemortem hyperglycemia; Jahrestagung der GTFCh 2011 in Mosbach/Baden (Poster).

Methylglyoxal - ein neuer Marker zum Nachweis einer antemortem Hyperglykämie? Frühjahrstagung Rechtsmedizin der Regionalgruppe Nord 2011 in Münster (Vortrag).

Anhydroglucitol and methylglyoxal - new marker for an antemortem hyperglycemia; TIAFT Meeting 2011 in San Francisco/USA (Vortrag).

Quantifizierung von humanem Insulin und seinen synthetischen Analoga in forensischen Fällen: Vergleich eines Immunoassays mit einer flüssigkeitschromatographisch/massenspektrometrischen Methode; Frühjahrstagung Rechtsmedizin der Regionalgruppe Nord 2012 in Bonn (Vortrag).

Determination of human and synthetic insulins and problems in forensics: comparison of immunoassay and liquid chromatographic mass spectrometric results; TIAFT Meeting 2012 in Hamamatsu/Japan (Poster).

Das molare Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid in klinischen und forensischen Fällen; Jahrestagung Rechtsmedizin 2012 in Freiburg (Vortrag).

Danksagung

Allem voran möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Frank Musshoff für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die fachliche Unterstützung und den großzügigen Gestaltungsfreiraum während der gesamten Promotionsarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Madea danke ich für die Bereitstellung der instrumentellen Mittel, der Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit und der guten Zusammenarbeit während meiner Zeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn.

Weiterhin danke ich meinen lieben Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für forensische Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin für die bereichernde Zeit am Institut, allen voran Jörg Bayer für die technische Unterstützung am LC/MS-Gerät, Pia Aymans für die große Hilfe bei der Probenvorbereitung.

Danken möchte ich auch den fleißigen Probensammlern aus Bonn (Julia Brünig und Charlotte Meister) und Bad Oeynhausen (Yvonne Mattern) und Herrn Dr. rer. nat. Bernd Stratmann für die fachliche Unterstützung bei klinischen Fällen. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Daldrup für die Bereitstellung von Probenmaterial und die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss danke ich den wichtigsten Menschen: Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Oma Helga, dass sie nicht nur in den vergangenen drei Jahren ständig für mich erreichbar waren und mich in allem, was ich getan habe, unterstützt haben. Ich habe mich nie gescheut, einen Gefallen von Ihnen zu erwarten und sie haben nie gezögert, mir diesen Gefallen zu tun. Und sie haben mir Werte wie Durchhaltevermögen, Bescheidenheit, Zurückhaltung, aber auch Selbstbewusstsein vermittelt, die mir auch bei dieser Arbeit zugute kamen. Und ich danke Gesa Kleine Borgmann, die mich in den letzten Monaten der Arbeit mit Kuchen, Käse, Oliven und Schinken kulinarisch und - noch viel wichtiger - mit viel Liebe versorgt hat.

Abkürzungsverzeichnis

AG	1,5-Anhydroglucitol
AGE	Advanced Glycation End Products
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
CE	Kollisionsenergie
CEL	N δ -1-Carboxyethyllysin
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CXP	cell exit potential
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray Ionisation
DAD	Dioden-Array-Detektion
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DKA	Diabetische Ketoazidose
FID	Flammenionisationsdetektion
GC	Gaschromatographie
GKF	Glaskörperflüssigkeit
GTfCh	Gesellschaft für Toxikologie und forensische Chemie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HU	hypoglycaemia unawareness
HWZ	Halbwertszeit
IA	Immunoassay
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IRMA	Immunradiometric assay
IDE	insulin degrading enzyme
IS	Interner Standard
LoD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LoQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation- time of flight
MG	Methylglyoxal

MOLD	MG-Lysin-Dimer (1,3-di(Nε-lysino)-4-methyl-imidazolium
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
PMI	Post mortem Intervall (Zeit zwischen Tod und Obduktion)
PMSC	Phenylmethylsulfonylchlorid
Q (1 - 3)	Quadrupol
QC-Proben	Qualitätskontrollproben
RIA	Radioimmunoassay
(R) SD	(relative) standard deviation (relative Standardabweichung)
SGLT 4	sodium-glucose linked transporter
SPE	solid phase extraction
TBME	tert. Butyl-methyl-ether
TFA	Trifluoressigsäure
U	International Unit
V	Volt

1	EINFÜHRUNG	5
1.1	Diabetes und Diabetes-Typen	5
1.1.1	Therapie des Diabetes	5
1.1.2	Akute Komplikationen bei Diabetikern	6
1.2	Diabetes, Hypoglykämie und forensische Fragestellungen	10
1.3	Pathomorphologie	12
1.3.1	Hyperglykämie: Pathomorphologische Auffälligkeiten beim Toten	12
1.3.2	Hypoglykämie: Anamnese und pathomorphologische Auffälligkeiten beim Toten	12
1.4	Potentielle biochemische Parameter zum Nachweis einer Hyper- / Hypoglykämie	13
1.4.1	Glucose und Laktat	13
1.4.2	Glykierte Proteine	14
1.4.3	Insulin, C-Peptid und Proinsulin	15
1.4.4	Orale Antidiabetika	22
1.4.5	Methylglyoxal	26
1.4.6	Anhydroglucitol	29
1.4.7	Ketonkörper	30
1.5	Analytik	31
1.5.1	Glucose und Laktat	31
1.5.2	Glykierte Proteine	31
1.5.3	Humanes Insulin	32
1.5.4	C-Peptid	33
1.5.5	Proinsulin	34
1.5.6	Orale Antidiabetika	34
1.5.7	Methylglyoxal	34
1.5.8	Anhydroglucitol	35
1.5.9	Ketonkörper	35
1.6	Nachweis von Glucosestoffwechselentgleisungen im Lebenden bei forensischen Fragestellungen	36
1.7	Nachweis von Glucosestoffwechselentgleisungen post mortem	37
1.8	Massenspektrometrie	40
1.8.1	Elektrospray-Ionisation	41
1.8.2	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)	42
1.8.3	Triple-Quadrupol	42
1.8.4	Lineare Ionenfalle	44

1.8.5	Validierung massenspektrometrischer Methoden	45
1.9	Headspace-Gaschromatographie	47
1.10	Immunchemie	48
2	FRAGESTELLUNG	49
3	MATERIAL UND METHODEN	51
3.1	Allgemein	51
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	51
3.1.2	Puffer und Lösungen	51
3.1.3	HPLC-MS	51
3.1.4	Head-Space GC/FID	52
3.2	Validierung	52
3.2.1	Leermatrix	52
3.2.2	Selektivität und Spezifität	52
3.2.3	Linearität	53
3.2.4	Lösemittelkalibration	53
3.2.5	Genauigkeit	53
3.2.6	Matrixeffekte und Wiederfindung	54
3.2.7	Analytische Grenzen	55
3.2.8	Ionenverhältnisse	56
3.3	Analytik	56
3.3.1	Glucose und Laktat	56
3.3.2	Glykierte Proteine	58
3.3.3	Humanes und synthetische Insuline	59
3.3.4	C-Peptid	63
3.3.5	Proinsulin	64
3.3.6	Orale Antidiabetika	65
3.3.7	Methylglyoxal	70
3.3.8	Anhydroglucitol	73
3.3.9	Ketonkörper	75
3.4	Probenmaterial	76
3.4.1	Klinische Proben	76
3.4.2	Vergleich der immunchemischen mit der chromatographischen Methode für humanes Insulin	77
3.4.3	Forensische Proben	77
3.4.4	Statistische Auswertung	78
		2

4	ERGEBNISSE	79
4.1	Analytische Methodenentwicklung	79
4.1.1	Humanes und synthetische Insuline	79
4.1.2	C-Peptid	82
4.1.3	Orale Antidiabetika	83
4.1.4	Methylglyoxal	88
4.1.5	Anhydroglucitol	89
4.2	Klinische Proben	91
4.2.1	Glucose	91
4.2.2	HbA1c	92
4.2.3	Fructosamin	92
4.2.4	Humanes und synthetische Insuline	93
4.2.5	C-Peptid	97
4.2.6	Das molare Verhältnis humanes Insulin:C-Peptid	99
4.2.7	Proinsulin	100
4.2.8	Methylglyoxal	103
4.2.9	Anhydroglucitol	103
4.2.10	Zusammenhang der Parameter	104
4.3	Forensische Proben	108
4.3.1	Glucose und Laktat	108
4.3.2	Summenformel nach Traub	110
4.3.3	HbA1c	111
4.3.4	Fructosamin	112
4.3.5	Methylglyoxal	113
4.3.6	Anhydroglucitol	115
4.3.7	Humanes Insulin	115
4.3.8	Zusammenhang der Parameter	115
5	DISKUSSION	119
5.1	Analytische Methodenentwicklung	119
5.1.1	Humanes und synthetische Insuline	119
5.1.2	C-Peptid	122
5.1.3	Orale Antidiabetika	123
5.1.4	Methylglyoxal	124
5.1.5	Anhydroglucitol	126
5.2	Klinische Proben	126
5.2.1	Humanes und synthetische Insuline	126

5.2.2	C-Peptid	129
5.2.3	Das molare Verhältnis humanes Insulin : C-Peptid	130
5.2.4	Proinsulin	130
5.2.5	Orale Antidiabetika	131
5.2.6	Methylglyoxal	133
5.2.7	Anhydroglucitol	134
5.2.8	Hypoglykämien im Straßenverkehr	135
5.3	Forensische Proben	140
5.3.1	Glucose und Laktat	140
5.3.2	HbA1c	142
5.3.3	Fructosamin	144
5.3.4	Der Nachweis von humanem und synthetischen Insulinen	145
5.3.5	Methylglyoxal	149
5.3.6	Anhydroglucitol	149
5.3.7	Hypoglykämien post mortem	150
5.3.8	Hyperglykämien post mortem	152
5.3.9	Anwendungsbeispiele Hyperglykämie	155
5.3.10	Anwendungsbeispiele Hypoglykämie	160
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	162
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	165
8	TABELLENVERZEICHNIS	167
9	LITERATURVERZEICHNIS	168

1. Einführung

1 Einführung

1.1 Diabetes und Diabetes-Typen

Diabetes mellitus ist eine weltweit auftretende chronische Krankheit. Ungefähr 285 Millionen Menschen sind zur Zeit von dieser Krankheit betroffen [1]. Diabetes wird gleichermaßen selten in Todesbescheinigungen [2, 3] als Krankheit (es kann mit weiteren 8% Menschen mit unentdecktem Diabetes mellitus gerechnet werden) bzw. Todesursache [4, 5] festgehalten. Dabei sind Folgen einer Diabeteserkrankung die siebthäufigste Todesursache in den Entwicklungsländern (2007 waren Diabetes und dessen Folgen bei 2,7 % der Verstorbenen die Todesursache) [6].

Eine konstante Hyperglykämie bei Diabetikern ist auf einen Mangel an Insulin zurückzuführen (siehe Kapitel 1.4.3.1). Dieses Protein wird durch die β -Zellen des Pankreas in den Blutstrom abgegeben, sobald diese durch eine hohe Blutglucosekonzentration stimuliert werden. Insulin und sein Vorläuferprotein Proinsulin haben beide die Fähigkeit, Blutglucosekonzentrationen zu senken

Grundsätzlich wird Diabetes mellitus in zwei Klassen aufgeteilt: Typ 1 Diabetes ist durch eine autoimmunbedingte Zerstörung der β -Zellen im Pankreas und als Folge durch ein Fehlen der Insulinsekretion gekennzeichnet. Typ 2 Diabetes kann durch eine verminderte Insulinsekretion und eine Insulinresistenz des Gewebes charakterisiert werden. In Deutschland gehören ca. 90 % der Diabetiker zum Typ 2 und 5-10 % zum Typ 1 [7]. Dabei sind sowohl genetische als auch Umweltfaktoren (Übergewicht) an der Entstehung beteiligt. Der Primärbefund bei beiden Typen ist der Verlust der glykämischen Kontrolle. Die Diagnose eines Diabetes mellitus wird exklusiv durch diese dauerhafte Hyperglykämie, der erhöhten Glucosekonzentration im Plasma, gestellt (Tabelle 1).

1.1.1 Therapie des Diabetes

Typ 1- Diabetiker sind auf die Injektion von Insulin angewiesen. Das Ziel dieser Insulintherapie besteht darin, das Hormon in einer der physiologischen Sekretion ähnelnden Weise zu substituieren und normale Glucosekonzentrationen wiederherzustellen. Das humane Insulinmolekül wurde hierzu in den letzten Jahren derart modifiziert, dass durch sogenannte Insulinanaloga pharmakokinetische

1. Einführung

Vorteile im Vergleich zum humanen Insulin entwickelt werden konnten (siehe 1.4.3.2). Therapiemöglichkeiten für Typ 2- Diabetiker beinhalten zunächst orale Antidiabetika (siehe 1.4.4), viele sind aber ebenfalls auf exogenes Insulin angewiesen.

	Venöse Blutglucosekonzentration	Venöse Plasmaglukosekonzentration
Normale Konzentration und Diabetes-Symptome	> 180 mg/dl	> 180 mg/dl
Nach 12 h nüchtern	> 110 mg/dl	> 126 mg/dl
2 h nach einem Glucosetoleranztest	> 180 mg/dl	> 200 mg/dl

Tabelle 1: Optionale Kriterien für eine Diagnose von Diabetes [8];
1 mmol/l = 18,02 mg/dl

1.1.2 Akute Komplikationen bei Diabetikern

Trotz sehr variablen Intervallen zwischen Mahlzeiten oder gelegentlich beachtlicher Kohlenhydratlast nach Nahrungsaufnahme bleibt die Blutglucosekonzentration des gesunden Menschen innerhalb eines engen Bereichs (60-140 mg/dl [9]), da einige pathophysiologische Mechanismen vonstattengehen, falls die Glucosekonzentration aus diesem Bereich fällt. Diese Mechanismen sind bei Patienten mit der Diagnose Diabetes mellitus gestört, was zu den im Folgenden beschriebenen Konsequenzen führt.

1.1.2.1 Hyperglykämie

Coma diabeticum ist die schwerwiegendste Form einer hyperglykämischen Stoffwechselfunktionsstörung. Es kann zwischen diabetischer Ketoazidose (DKA) und einer hyperosmolaren Krise unterschieden werden. Die Pathogenese ist in Abbildung 1 dargestellt. Hohe Blutglucosekonzentrationen (Tabelle 4, Kapitel 1.4.1) und Ketonkörper im Blut führen zu den sofortigen medizinischen Konsequenzen wie fehlender Orientierung, Dehydrierung, Koma und Tod. Die jährliche Inzidenzrate für DKA wird zwischen 4,6 und 8 Episoden pro 1000 Patienten mit Diabetes angegeben

1. Einführung

[10, 11]. Die Mortalitätsrate bei Patienten mit DKA liegt bei $< 5\%$ [12]. Die Mortalität während einer DKA hängt von der Länge der Zeit zwischen Einsetzen der Ketoazidose und des Beginns der Behandlung, der Anwesenheit einer Sepsis und dem Alter ab. Die jährliche Inzidenz hyperosmolarer Komata ist geringer und liegt bei einem von 1000 Diabetikern [11], die Mortalität wird von den meisten Publikationen mit 15% beschrieben [13].

1.1.2.2 Hypoglykämie

Die gebräuchliche Definition für eine Hypoglykämie ist eine niedrige Blutglucosekonzentration (Tabelle 2). Allgemeine Symptome einer Hypoglykämie werden in Tabelle 3 zusammengefasst. Das Gehirn ist abhängig von Glucose und ist selbst nicht in der Lage, Glucose zu synthetisieren oder einzulagern. Die Unfähigkeit des Gehirns, dadurch in hypoglykämischen Situationen trotz normalem arteriellen Sauerstoffflusses Sauerstoff zu verwerten, resultiert in einer beeinträchtigten Gehirnfunktion [14]. Glukagon ist das wichtigste Hormon für die schnelle Genesung von einer akuten Hypoglykämie. Doch innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose eines Diabetes mellitus zeigen Patienten eine progressiv sinkende Glukagonantwort auf hypoglykämische Situationen [15]. Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnose sinkt auch die Adrenalin-Gegenregulation, was in einem Verlust der adrenergen Symptome (Tabelle 3) mündet. So kann eine Hypoglykämie - falls sie nicht mit schnell resorbierbaren Kohlenhydraten behandelt wird - mit dauerhaften Hirnschäden und signifikanter Mortalität einhergehen [16]. Die Prävalenz schwerwiegender Hypoglykämien wird mit 0,64 bzw. 1,6 Episoden pro Patient und Jahr, für Hypoglykämien mit Verlust des Bewusstseins mit 0,07 [17] oder 0,19 [18] pro Patient und Jahr angegeben.

Etwa 10-20 % der Patienten leiden an mindestens einer schwerwiegenden Hypoglykämie im Jahr [19, 20]. Die Einführung von Insulinanaloga in die Diabetestherapie konnte die Hypoglykämieraten um fast 25 % senken (Insulin lispro vs. humanes Insulin) [21], andere Studien konnten dies nicht bestätigen [22].

1. Einführung

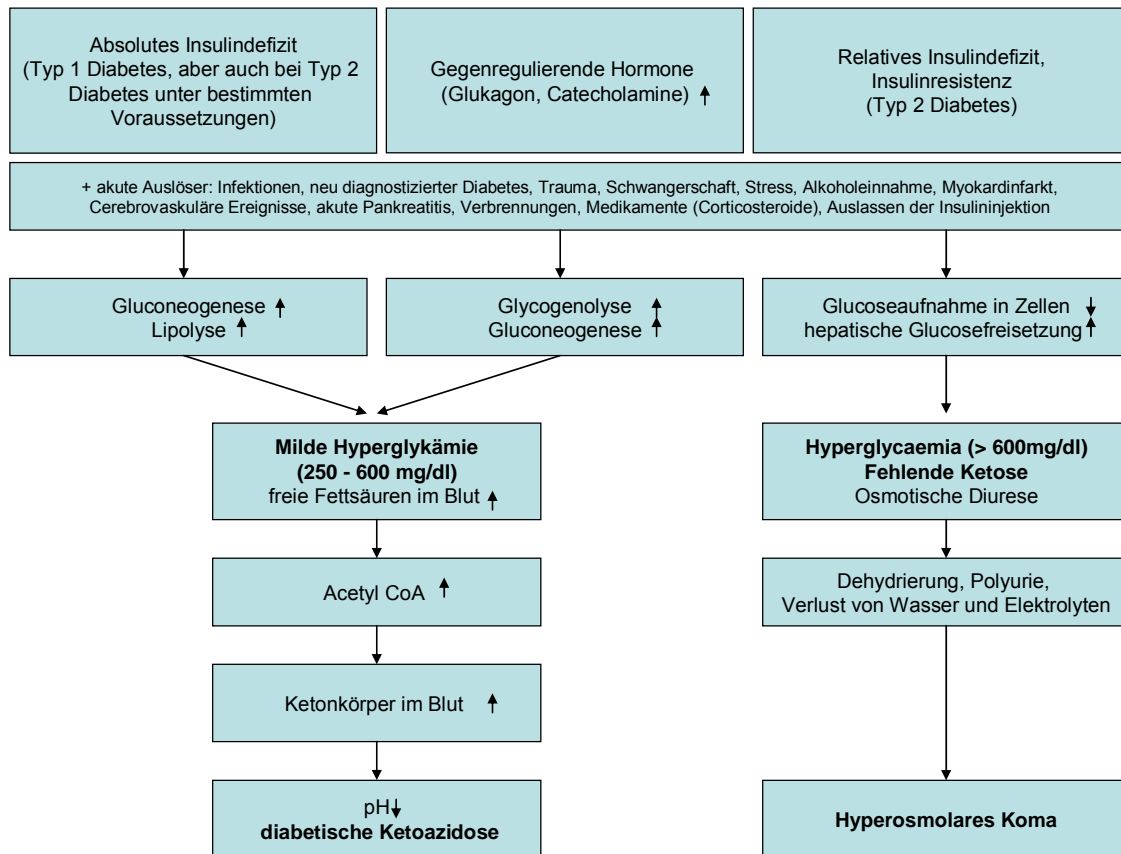


Abbildung 1: Pathogenese einer diabetischen Ketoazidose und eines hyperosmolaren Komats [11]

Plasma Glucosekonzentration	Reaktionen des menschlichen Körpers
40 - 83 mg/dl	Abfall der endogenen Insulinsekretion
58 - 63 mg/dl	Anstieg der Sekretion von Glukagon, Adrenalin und später Wachstumshormon als hormonelle Vertreter des autonomen Nervensystems mit antiinsulinärer Wirkung
< 56 mg/dl	Anstieg der Cortisol-Sekretion
< 54 mg/dl	Autonome Symptome der Hypoglykämie
< 45 mg/dl (< 40 mg/dl im Blut)	Definition Hypoglykämie und neuroglykopenische Symptome einer Hypoglykämie

Tabelle 2: Definition einer Hypoglykämie und die Reaktionen des menschlichen Körpers bei sinkender Glucosekonzentration [23]

1. Einführung

Adrenerge Symptome	Neuroglukopenische Symptome
Tachykardie	Fehlende Koordination / Konfusion
Unruhe fehlende Koordination	Müdigkeit
Kalter Schweiß	Verschwommenes oder doppeltes Sehen undeutliche / ausbleibende Sprache
Tremor	Konzentrationsmängel
Hunger	Schwächegefühl / Schwindel
Übelkeit	Paresthesien an Lippen und Zunge
Flush	Übelkeit / Erbrechen
Herzrasen	Kopfschmerzen
Angst (das Bewusstsein zu verlieren)	Durst
Kältegefühl	Benommenheit
Reizbarkeit	Koma

Tabelle 3 : Mögliche Symptome einer Hypoglykämie

Eine Überdosis Insulin ist die häufigste Ursache einer Hypoglykämie [24]. Die Ausbildung einer Hypoglykämie dauert mindestens 20 Minuten nach der Injektion von Insulin. Dosis und Typ Insulin stehen in engem Zusammenhang mit der Dauer, nicht aber mit dem Schweregrad einer Hypoglykämie [25]. Weitere Ursachen von Hypoglykämien sind Mangelernährung, abnorme physische Anstrengung, chronischer Alkoholismus, Therapiefehler, Insulinome (Zelltumore in den Inselzellen des Pankreas), "reaktive Hypoglykämien" nach der Zufuhr von Zucker, Autoimmunhypoglykämien oder Drogen- bzw. Toxin- induzierte Hypoglykämien. Potentielle Medikamente, die eine Hypoglykämie auslösen oder noch verstärken, wurden beschrieben: Acetylsalicylsäure stimuliert die Glucoseaufnahme durch den Muskel. Einige β -Blocker verhindern die Glykogenolyse im Muskel und die periphere Glucosemobilisierung [26], stumpfen die Glukagon-Antwort auf die Hypoglykämie ab [27] und maskieren außerdem die durch Adrenalin hervorgerufenen Symptome einer Hypoglykämie.

Die Behandlung mit insulinotropen oralen Antidiabetika kann ebenfalls zu Hypoglykämien führen, besonders wenn die Therapie mit Sulfonylharnstoffen der ersten Generation erfolgt. Sulfonylharnstoffe führen aber seltener zu Hypoglykämien

1. Einführung

als Insulin [28]. Jennings et al. zeigten eine Inzidenz von Hypoglykämien von 20 % bei Diabetikern, die mit Sulfonylharnstoffen behandelt wurden [29]. Neuere Substanzen wie Glimepirid oder die Glinide zeigen kaum Tendenzen zur Ausbildung von Hypoglykämien [30, 31].

1.2 Diabetes, Hypoglykämie und forensische Fragestellungen

Diabetische Stoffwechsellentgleisungen können bei der Teilnahme am Straßenverkehr in hypoglykämischem Zustand nach der Einnahme von Insulin oder insulinotropen Substanzen forensisch relevant werden [32]. Die Nebenwirkungen der Diabetestherapie (hauptsächlich Hypoglykämie) und das durch diabetische Folgekomplikationen (hauptsächlich das Sehvermögen betreffend, aber auch Mikro- und Makroangiopathie, Neuropathie, Nierenversagen, Herzinfarkt) hervorgerufene potentielle Risiko können eine Bedrohung bzw. Behinderung im Straßenverkehr darstellen. Besonders die diabetische Retinopathie spielt im Straßenverkehr eine Rolle, Reduktion der Sehschärfe, Einschränkung des Gesichtsfeldes oder auch Probleme im Farbsehen können die Folge sein [33]. In der forensischen Praxis ist aber hauptsächlich die akute Komplikation Hypoglykämie von Interesse. Sie kann zu jedem Zeitpunkt auftreten und kann einen Bewusstseinsverlust zur Folge haben. Hyperglykämie spielt in diesem Kontext eine untergeordnete Rolle, da sich diese langsamer entwickelt und mit klaren klinischen Symptomen einhergeht. Ob Straßenverkehrsunfälle bei mit Insulin behandelten Diabetikern häufiger vorkommen, bleibt umstritten: manche Studien zeigen eine Signifikanz auf [34, 35], andere nicht [36]. Laborstudien mit Fahrsimulatoren haben demonstriert, dass schon durch milde Hypoglykämien kognitive Funktionen, die wichtig für das Führen eines Fahrzeuges sind (visuelle Informationsverarbeitung, Reaktionszeit, Aufmerksamkeit, Hand-Auge-Koordination), eingeschränkt werden [37]. Die minimale Blutglucosekonzentration, die für die Teilnahme am Straßenverkehr als erforderlich angesehen wird, beträgt 72 mg/dl [38].

In Deutschland gelten folgende Regelungen, um als Diabetiker ein Fahrzeug im Straßenverkehr führen zu dürfen [39]: Wer zu Zuckerstoffwechselerkrankungen wie Hypo- und/oder Hyperglykämie tendiert, ist grundsätzlich nicht in der Lage, ein Kraftfahrzeug zu führen. Dies gilt für Diabetiker in der Phase der Einstellung ihrer

1. Einführung

Medikation. Gut eingestellte Diabetiker dürfen Fahrzeuge aller Kategorien fahren. Nach einer Entscheidung des bayrischen Verwaltungsgerichts im Jahre 1989 dürfen Diabetiker unter der Voraussetzung, dass sie unter Therapie mit oralen Antidiabetika oder Insulin stehen und keine hypoglykämische Attacke in den vorausgehenden 3 Monaten hatten, neben der Führerscheinklasse A und B auch die Führerscheinklasse C und E besitzen. Dies setzt regelmäßige Kontrollen voraus und zu Beginn einer Insulintherapie ist die Teilnahme am Straßenverkehr aufgrund möglicher Sehstörungen strengstens verboten. In der deutschen "Fahrerlaubnis-Verordnung (FeV)", §§ 11, 13 und 14, Nummer 5.1 - 5.4 sind diese Voraussetzungen definiert. Wenn Diabetiker allerdings zu schweren Stoffwechsellentgleisungen neigen, dürfen sie den Führerschein nicht erhalten [40]. Bisher war für beantragende Betroffene die Angabe über den Diabetes freiwillig. Ab dem Jahr 2013 werden jedoch die EU-Führerscheinrichtlinien in nationales Recht umgesetzt: Menschen mit Diabetes mellitus müssen dann bei einem Antrag auf Erteilung der Fahrerlaubnis künftig ein medizinisches Gutachten eines Facharztes mit verkehrsmedizinischer Qualifikation vorlegen [41].

Weiterhin erlangen diabetische Stoffwechsellentgleisungen forensisches Interesse bei der Diagnose „Glucosestoffwechsellentkrankung“ post mortem. Diese ist in der forensischen Praxis im Rahmen einer Sektion häufig schwierig, da klare morphologische Auffälligkeiten fehlen. Dabei muss ein todesursächliches diabetisches Koma erkannt werden. Außerdem wurden auch Fälle beschrieben, in denen Insulin oder insulinotrope Substanzen als Selbstmord- (Suizid oder faktitiöse/künstliche Hypoglykämie, Munchausen by proxy Syndrom) oder Mordmittel eingesetzt werden. Im 2005 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers standen 0,16% (3934 Fälle) der berichteten Aufnahmen in Zusammenhang mit Insulin [42], im Report aus dem Jahr 2007 waren es schon 0,70% (17270 Fälle) [43]. Von Mach et al. legten allerdings in einem Review dar, dass 90 % der Insulin-Überdosen suizidalen Hintergrund hatten [44]. Arem [45] fand bis 1985 81 Fälle von faktitiöser Hyperinsulinämie, weitere Suizide mit Insulin wurden beschrieben (z.B. [46]). Seit synthetische Insuline auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich sind, wurden sowohl kurz- als auch langwirksame Insuline zum Selbsttod benutzt (57.8 % vs. 42.8 %) [44]. Marks gibt einen Überblick über die beschriebenen 53 Insulinmorde bis 1999 [47] und weitere 13 Fälle in den Jahren 1999 bis 2009 [48].

1. Einführung

1.3 Pathomorphologie

1.3.1 Hyperglykämie: Pathomorphologische Auffälligkeiten beim Toten

Im Falle des Verdachts auf ein diabetisches Koma ist die Kenntnis über einen vorliegenden Diabetes mellitus, dessen Dauer, Verlauf, Therapie und die therapeutische Disziplin von Wichtigkeit. Vor dem Tod sind bei Patienten mit anschließendem hyperglykämischem Koma meist Symptome wie Poly- / Dysurie, Polydipsie, Polyphagie, Erbrechen, Bauchschmerzen, Schwächegefühl, Fieber, Brustschmerzen, Kurzatmigkeit, Hypotonie, Tachykardie und neurologische Defizite zu beobachten. Physische Zeichen können Dehydrierung, trockene Mucosamembranen, Hautschwellungen, und die sogenannte Kussmaul-Atmung (schnelles und tiefes Ausatmen mit Aceton-Geruch) sein [49].

Während einer Obduktion kann häufig eine fettige Veränderung der Niere mit gelb-roter Eintrübung des Nierenparenchyms beobachtet werden. Weitere Diabetes-spezifische Organveränderungen sind die diabetische Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson (siehe auch Abbildung 46) [50] oder eine Fettleber. Beckmann [51] zeigte, dass eine Fettleber häufiger bei Diabetikern auftaucht, brachte diesen Fakt aber in Zusammenhang mit der höheren Inzidenz von Adipositas unter Diabetikern. Meistens sind arteriosklerotische Veränderungen der peripheren, Koronar-, Becken- oder Hirnarterien zu beobachten [52]. Eine Xanthochromie (Gelbverfärbung) des Craniums ist ein relativ häufiger Sektionsbefund bei Diabetikern [53].

Eine histologische Untersuchung erbringt häufig hilfreiche Befunde wie z.B. eine Glykogen-Nephrose mit sogenannten Armanni-Ebstein Zellen (siehe auch Abbildung 46), die sehr spezifisch für eine langanhaltende Hyperglykämie > 500 mg/dl sind [51].

1.3.2 Hypoglykämie: Anamnese und pathomorphologische Auffälligkeiten beim Toten

Während einer Sektion können kaum pathomorphologische Befunde erhoben werden, die direkt auf eine Überdosis mit Insulin oder oralen Antidiabetika hindeuten. Weniger bekannte Nebenwirkungen einer zu hohen Dosis Insulin sollten ggf. als Hinweis in Erwägung gezogen werden: Hypokalämie, Hypophosphatämie, Hypomagnesiämie [54], akute Fettleber [55] oder akutes Lungenödem [56]. Die erste Reaktion des Gehirns auf mangelnde Glucosekonzentrationen zeigt sich meist in

1. Einführung

einer Schwellung, in einem Gehirnödem. Intrinsische Ursachen einer Hypoglykämie, insbesondere ein Insulinom, sollten bei der Obduktion ausgeschlossen werden.

Falls eine Injektionsstelle gefunden werden kann, kann das Ausschneiden der Injektionsstelle und der immunhistochemische [57] oder toxikologische Nachweis des Insulins in Betracht gezogen werden.

1.4 Potentielle biochemische Parameter zum Nachweis einer Hyper- / Hypoglykämie

	Glucose [mg/dl]	Laktat [mg/dl]
Arteriell es Blut	74 - 106 nüchtern < 140 postprandial	4,5 - 20
Venös es Blut	74 - 106 nüchtern ~ 40 niedriger als in arteriellem Blut postprandial	< 16,3
Diabetische Ketoazidose	> 600	> 21,6
Hyperosmolares Koma	250 - 600	> 35

Tabelle 4: Referenzkonzentrationen von Glucose und Laktat im Blut und Konzentrationen in hyperglykämischen Situationen [58]

1.4.1 Glucose und Laktat

Die Diagnose einer glykämischen Stoffwechsellage ante und post mortem basiert auf der Feststellung einer hohen bzw. niedrigen Glucosekonzentration. Post mortem kann auch noch die Laktatkonzentration in Betracht gezogen werden, da Glucose nach dem Tod in Laktat umgewandelt wird. Referenzkonzentrationen für beide Parameter sind in Tabelle 4 dargestellt.

1. Einführung

1.4.2 Glykierte Proteine

Serumproteine werden posttranslational durch eine langsame nichtenzymatische Reaktion zwischen Glucose und Aminogruppen von Proteinen glykiert [59]. In der Diabetesdiagnostik hat sich vor allem die Quantifizierung des HbA1c zur Bestimmung der glykämischen Kontrolle durchgesetzt. HbA1c ist als an ein oder beide

N-terminale Valine der β -Kette des Hämoglobins gebundene D-Glucose definiert. Das Ausmaß der HbA1c-Synthese steht in Zusammenhang mit der Glucosekonzentration, der die Erythrozyten ausgesetzt sind [60]. Glykiertes Hämoglobin ist - einmal gebildet - stabil und akkumuliert während der gesamten Lebensspanne eines roten Blutkörperchens. Daher ist es ein nützlicher Index während der vorausgehenden 120 Tage und um eine längerfristige Glykämie zu beurteilen [61]. Gleichwohl ist es nicht geeignet, um kurzfristige Änderungen in der Glucosekonzentration zu überprüfen. Die HbA1c-Konzentration wird erst nach einer 12 Stunden anhaltenden Hyperglykämie beeinflusst [62], kurze Hyperglykämien sind ohne Auswirkung auf den HbA1c. Im Jahr 2008 änderte die diabetische Gesellschaft die Einheit des HbA1c von % (des totalen Hämoglobins) in mmol HbA1c/mol Hämoglobin [63].

Als Alternative zum HbA1c (z.B. bei hämolytischer Anämie) im Routinemanagement gilt das Fructosamin [64]. Die Albumin-Konzentration spiegelt zu einem Großteil (80% [65]) die Fructosamin-Konzentration ("glykierte Proteine im Blut") wider. Die durchschnittliche Halbwertszeit von Plasmaproteinen beträgt 5-15 Tage. Daher stellt die Bestimmung des Fructosamin einen sich schneller auf glykämische Missstände einstellenden Parameter als HbA1c dar und dient als ein Index für die intermediäre Glucosekontrolle (1-3 Wochen) [64, 66]. Referenzkonzentrationen der glykierten Proteine sind in Tabelle 5 dargestellt.

Ritz et al. [67] untersuchten die erhöhte α 1-Antitrypsin- und Haptoglobin-Glykosylierung als Index einer Hyperglykämie vor dem Tod. Beide Peptide glykosylieren deutlich schneller als Albumin oder Hämoglobin. Diese schnelle Glykosylierung erleichtern die Detektion von schnellen Veränderungen im glykämischen Status eines Patienten. Die α 1-Antitrypsin und Haptoglobin-Glykosylierung scheint eine ante- und post-mortem Unterscheidung zwischen Normoglykämie und Hyperglykämie zu erlauben, es sind jedoch noch umfangreichere Studien notwendig.

1. Einführung

	HbA1c im Blut IFCC Einheit [mmol/mol]	HbA1c im Blut DCCT Einheit [%]	Fructosamin im Serum [μmol/l]
Nicht-Diabetiker	15 - 44 [58, 68]	3,5% - 6,2% [58, 69]	205 - 285 [58, 70]
Ziel der Einstellung in der Therapie des Diabetes	< 48	< 6,5%	< 320 [58]
Wert, ab dem eine Neubewertung der Therapie erfolgen sollte	> 64 [71]	> 8 % [71]	320 - 370
Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus	> 86	> 10 %	> 370 [72]
Während eines Coma diabeticum	> 109 [73]	> 12,1 % [73]	

Tabelle 5: Referenzkonzentrationen HbA1c und Fructosamin. IFCC = International Federation of Clinical Chemistry; DCCT = The Diabetes Control and Complications Trial.

1.4.3 Insulin, C-Peptid und Proinsulin

1.4.3.1 Strukturen und Biosynthese

Humanes Insulin ist ein Peptidhormon mit einer Molekülmasse von 5808 Da, das vom Pankreas sezerniert wird. Es besteht aus 51 Aminosäuren, die sich auf zwei Peptidketten verteilen, einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken verbunden. Ein Vorläuferprotein, Präproinsulin, wird im endoplasmatischen Retikulum der β -Zellen des Pankreas gebildet und wird direkt nach der Synthese durch mikrosomale Enzyme in Proinsulin gespalten.

1. Einführung

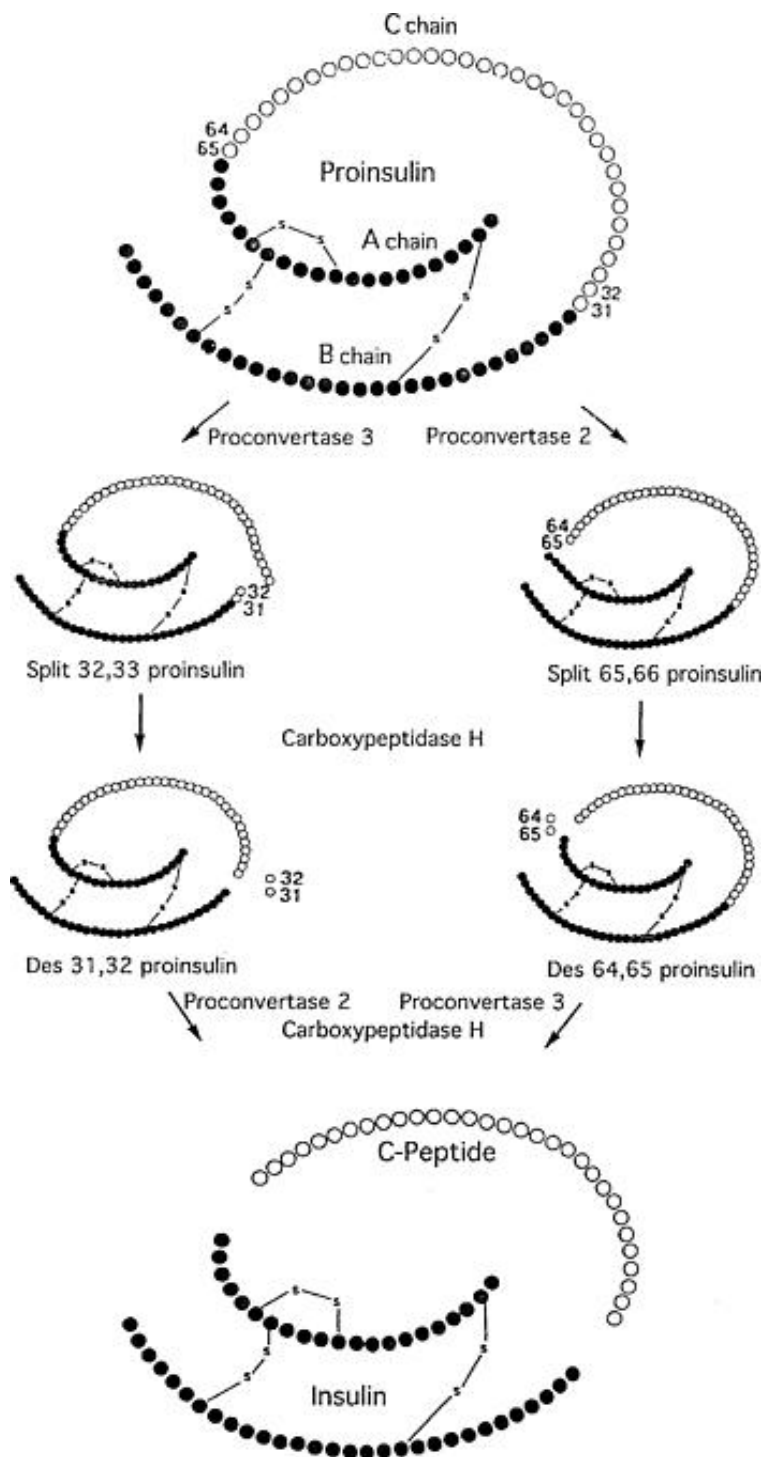


Abbildung 2: Abbau von Proinsulin zu Insulin und C-Peptid [74]

Proinsulin, das aus einer Einzelkette aus 86 Aminosäuren besteht (Abbildung 2), wird in den Golgi-Apparat transportiert. Das Reifen sekretorischer Partikel im Golgi-Apparat ist verbunden mit der Spaltung von Proinsulin in Zwischenprodukte, in Insulin und das C-Peptid. Das C-Peptid ist ein Polypeptid (31 Aminosäuren) mit einer Molekülmasse von 3017 Da [75]. Unter physiologischen Bedingungen enthalten gesunde reife sekretorische Granulae im Pankreas äquimolare Mengen an Insulin

1. Einführung

und C-Peptid plus 2-6 % intaktes und gespaltenes Proinsulin [76]. Wenn die β -Zellen durch eine hohe Blutglucosekonzentration stimuliert werden, werden die beiden Peptide in äquimolaren Mengen in den Blutstrom abgegeben. Insulin und Proinsulin (Proinsulin weist nur 5-10 % der Bioaktivität von Insulin auf [77]) haben beide die Fähigkeit, Blutglucoselevel zu senken. Die physiologische Funktion des C-Peptids ist noch unklar.

1.4.3.2 Die Insulintherapie

In den letzten Jahren wurde das humane Insulinmolekül (Struktur in Abbildung 3) modifiziert, sodass man heute humanes Insulin und synthetische Insulinanaloga in der Therapie des Diabetes mellitus anwendet. *Tabelle 6* zeigt den Wirkbeginn, das Wirkmaximum und die Wirkdauer der verschiedenen Insuline auf dem deutschen Arzneimittelmarkt. Nur zwei Darreichungsformen von humanem Insulin sind noch auf dem Markt: lösliches reguläres Insulin und NPH (neutrales Protamin Hagedorn) und Kombinationen der beiden. NPH-Insulin ist humanes Insulin, das an Protamin gebunden ist.

Schnell wirkende Insulinanaloga sollen die postprandiale Insulinsekretion imitieren. Insulin lispro, Insulin aspart und Insulin glulisin weisen eine beträchtlich geringere Neigung zur Assoziation auf und sind daher nach subkutaner Injektion schneller bioverfügbar und kürzer wirksam. Die Strukturen sind in Abbildung 3 dargestellt. Bei Insulin lispro (Humalog[®]) sind in der B-Kette Pro28 and Lys29 gegeneinander ausgetauscht. Die maximale Konzentration ist etwa 3mal höher als bei regulärem Insulin in derselben Dosierung. Bei Insulin aspart (Novomix[®]) ist Pro28 gegen Asp ausgetauscht. Es wird schneller als Humaninsulin resorbiert und erreicht eine maximale Konzentration im Plasma, die doppelt so hoch ist wie die des Humaninsulin. Bei Insulin glulisin (Apidra[®]) ist Lys29 gegen Glutamat ausgetauscht während Asp3 gegen Lysin ausgetauscht ist. [78, 79]

1. Einführung

Der Vorteil der langwirksamen Analoga (Insulin glargin, Insulin detemir) ist ihre peakfreie und konstante Wirkung, welche die basale oder Hintergrundinsulinsekretion imitieren soll. Insulin glargin (Lantus®) kann durch eine langsame Diffusion aus dem subkutanen Depot charakterisiert werden. Die Änderung der Aminosäurekette (die B-Kette ist am C-Ende durch zwei Arginine verlängert, in der A-Kette ist Asp21 durch Glycin ersetzt) verändert die pH-abhängige Ladung des Moleküls, sodass Injektionslösungen einen pH von 4 aufweisen und die Substanz in Wasser löslich ist. Nach der Injektion ins Gewebe kristallisiert Glargin aus und entwickelt hexamere Assoziate, aus denen es nur langsam befreit wird. Insulin detemir (Levemir®) stellt ein Konjugat aus genverändertem Insulin (das B-Ketten Thr30 wird entfernt) und Myristinsäure an der nun letzten Aminosäure der B-Kette, Lys29, dar. In pH-neutraler Injektionslösung liegt detemir als Hexamer vor. Der hydrophobe Fettsäurerest führt das Insulin in eine erhöhte Bindung mit Plasmaproteinen und zu einer verzögerten Freisetzung aus dem subkutanen Depot. [78, 79]

Insulintyp	Wirkbeginn	Wirkhöhepunkt	Wirkdauer
Insulin lispro	0,2 - 0,5 h	0,5 - 2 h	3 - 4 h
Insulin aspart	0,2 - 0,5 h	0,5 - 2 h	3 - 5 h
Insulin glulisin	0,2 - 0,5 h	0,5 - 2 h	4 h
Humanes Insulin	0,5 - 1 h	2 - 3 h	6 - 8 h
NPH	1 - 2 h	5 - 7 h	13 - 18 h
Insulin glargin	1 - 2 h	flach	20 h
Insulin detemir	1 - 2 h	6 - 8 h	17 - 20 h

Tabelle 6: Wirkbeginn, Wirkhöhepunkt und Wirkdauer von Normalinsulin und synthetischen Insulinen auf dem Arzneimittelmarkt [79, 80]

1. Einführung

1.4.3.3 Referenzkonzentrationen

Die endogene Insulinkonzentration wird durch mehrere Faktoren beeinflusst: Ernährungszustand, Adipositas, Alter, Geschlecht, Herkunft und auch durch die Messmethode [81]. Leider basieren die Referenzkonzentrationen (Tabelle 7) meist auf einer limitierten Anzahl (gesunder) Probanden, sie sollten allerdings auf den dazugehörigen Glucosekonzentrationen basieren [80]. Am Tag werden ca. 454 ± 108 nmol ($7,217$ nmol = 1U) Insulin und 367 ± 89 nmol C-Peptid vom gesunden menschlichen Pankreas abgegeben [82]. Ein Großteil dieses Insulins ist frei, nur ein geringer Teil an Globuline gebunden [78]. Die Leber kann die Produktion von Glucose komplett einstellen, wenn die Insulinkonzentration unter $50 \mu\text{U/ml}$ fällt [83]. Wenn im Gegensatz dazu in hypoglykämischen Situationen Glucosekonzentrationen unter 81 mg/dl fallen, sinken die Insulinkonzentrationen und bei $< 54 \text{ mg/dl}$ wird kein Insulin mehr sezerniert [84].

Die Bestimmung des C-Peptids ist zum Nachweis einer Injektion mit humanem Insulin vonnöten [85], um die Sekretion des Pankreas zu evaluieren. Im Falle einer Insulininjektion kann man nicht zwischen dem endogenen Insulin der β -Zellen und injiziertem humanem Insulin unterscheiden. Die Insulininjektion verändert das molare Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid (I:C) zugunsten von Insulin. Insulinkonzentrationen im Serum sind hoch, C-Peptid-Konzentrationen sind durch einen negativen Feedback-Mechanismus [86], der die Teilung des Proinsulinmoleküls stoppt, niedrig bzw. nicht detektierbar [48]. Sowohl Insulin als auch das C-Peptid werden durch Enzyme mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (HWZ) abgebaut. Zirkulierendes intaktes Humaninsulin hat eine HWZ von 5 min [87] und ist in 10-20 min aus dem Kreislauf verschwunden [88]. Der Insulinabbau ist die Folge der Arbeit des Enzyms Glutathion-Insulintranshydrogenase in Leber, Niere, Plazenta, Muskel und zu einem geringeren Ausmaß im Plasma an A- und B-Kette, die vorher durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken getrennt wurden [89]. Etwa 50 % wird bei einem Durchgang durch die Leber entzogen. Das C-Peptid wird hauptsächlich durch die Niere abgebaut, passiert die Leber ohne Extraktion durch Hepatozyten und hat eine HWZ von 30 min. Daher hat das C-Peptid ($4,4 \text{ ml/min}$) eine erheblich niedrigere Clearancerate als Insulin ($11\text{-}34 \text{ ml/min}$) [90]. Als Konsequenz erreichen Insulin und C-Peptid abhängig von Größe und Zusammensetzung ihre maximalen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Glucosezufuhr. Sie sind nicht in äquimolaren Mengen im Serum

1. Einführung

aufzufinden, die C-Peptid-Konzentrationen sind meist 5-10fach höher als die Insulinkonzentrationen in venösem Blut (Referenzkonzentrationen in Tabelle 7).

Proinsulin wird nur in sehr geringen Mengen in den Blutstrom abgegeben. Von Lebermetabolismus verschont, ist die HWZ höher als die des Insulins (90 min). So akkumuliert Proinsulin im Blut und macht 15-20% der gesamten Menge Insulin plus Proinsulin aus [91]. Das Verhältnis Insulin / Proinsulin wird mit 3,4:1 bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu 6:1 beim Gesunden, 1:1 bei Insulinompatienten und 10:1 bei Sulfonylharnstoff-Überdosierungen beschrieben [92]. Neben intaktem Proinsulin kommt im Plasma vor allem des_{31,32}-Proinsulin vor, beide liegen in etwa äquimolaren Mengen vor und werden als "Proinsulin-like material" bezeichnet [93]. Dieses ist bei Insulinom-Patienten [92, 94] und auch bei Typ 2 Diabetikern erhöht [95, 96]. Die Proinsulinsekretion wird wie die endogene Insulin- und C-Peptid-Sekretion durch eine Hypoglykämie unterdrückt. In pharmazeutischen Präparaten ist kein Proinsulin enthalten, weshalb das Auffinden im Plasma eines hypoglykämischen Patienten ein Beweis dafür ist, dass aufgefundenes Insulin endogenen Ursprungs ist [97].

	Humaninsulin	C-Peptid	I:C-Verhältnis	Proinsulin
Nüchtern-Referenzkonzentrationen bei Nicht-Diabetikern	5 - 30 µU/ml [85, 98, 99]	140 - 1120 pmol/l [100]	0,13 [101] 0,1 [92]	< 11 pmol/l [102]
Nach Glucoseeinnahme	Bis zu 120 µU/ml [103] Bis zu 200 µU/ml [9]	Bis zu 2800 pmol/l [100, 104] Bis zu 1596 pmol/l [9]	0,19 [101] 0,12±0,47 [85]	8,5 - 11,3 pmol/l [9]
Für die Diagnose einer Hypoglykämie im Lebenden	< 4,14 µU/ml [105] < 4,97µU/ml [106]	< 300 pmol/l [105] < 200 pmol/l [106-108]		< 20pmol/l [105] < 5pmol/l [107]

Tabelle 7: Referenzkonzentrationen von humanem Insulin, C-Peptid, dem molaren Verhältnis Insulin : C-Peptid und von Proinsulin

1. Einführung

1.4.3.4 *Insulin als Mordgift*

Grundsätzlich ist eine Insulinvergiftung eine ineffektive (Selbst)mordvariante aufgrund der vergleichsweise langen Zeit (ca. 15-30 min) bis zum Eintritt einer lebensgefährlichen Hypoglykämie. Weiterhin ist die Diagnose der entstehenden Hypoglykämie im Lebenden relativ einfach und die Behandlung schnell und einfach durchführbar [48]. Einige frühere Berichte dokumentieren, dass die Dosis des injizierten Insulins unabhängig ist von der letztendlichen Prognose. Lindqvist et al. [109] erachteten 100 U Humaninsulin als die minimal letale Dosis, während Marks [48] 300 - 550 U als minimale letale Dosis ansah. Todesfolge hatte bereits eine Dosis von 400 U Normalinsulin [110, 111], während Menschen Dosen bis zu 3000 U überlebten und ihre volle Gesundheit wiedererlangten [112, 113]. Ein großer Bereich an Dosen wurde für Suizide mit Insulin benutzt (von 100 bis 2000 U, im Durchschnitt 1220 U) [114]. Es konnte keine Korrelation zwischen den durch Täter angegebenen Dosen und den post-mortem Konzentrationen gefunden werden [25].

1.4.4 **Orale Antidiabetika**

Für die Therapie von Typ 2- Diabetikern stehen auch Antidiabetika in peroraler Form zur Verfügung. Wirkstoffgruppen, Wirkmechanismen und Wirkstoffe sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Diagnose einer hypoglykämischen Entgleisung unbekannter Ursache beinhaltet die Möglichkeit, dass der Patient diese oralen Antidiabetika eingenommen hat. Bei der Entstehung von Hypoglykämien spielen hauptsächlich Sulfonylharnstoffe eine Rolle, die aufgrund ihrer insulinotropen Wirkung häufig diese Nebenwirkung aufweisen. Neben diesen können auch Glinide, die sich zwar strukturell, nicht aber in ihrem Wirkmechanismus von den Sulfonylharnstoffen unterscheiden, Hypoglykämien auslösen. Sie binden an Rezeptoren auf pankreatischen β -Zellen und stimulieren die Insulinsekretion, indem Kaliumkanäle inhibiert werden. PPAR γ -Agonisten (peroxisome proliferator-activated receptor) haben keinen Einfluss auf die Sekretion von Insulin, erhöhen allerdings die Sekretion von Proteinen, die für den Glucosetransport verantwortlich sind. So erhöhen sie die Glucoseaufnahme in die Gewebe und führen nur selten zu Hypoglykämien.

Strukturen aller relevanten oralen Antidiabetika sind in Abbildung 4 dargestellt. Peakplasmakonzentrationen werden 1-8 h nach Einnahme erreicht, das Einsetzen von Hypoglykämien in Situationen akuter Überdosierung kann in weniger als 8 Stunden eintreten [115] aber auch für einige Tage verzögert sein [116].

1. Einführung

Wirkstoff	Maximale Plasmakonz.[ng/ml]	Plasma-protein-bindung [%]	HWZ [h]	Hepatische Metabolisierungsrate [%]	renale Eliminierung [%], davon unverändert [%]	Wirkeintritt [h]	Maximale Wirkung [h]	Wirkdauer [h]
Glibenclamid	100 1-2 h nach 1,75 mg	99	1,3 - 2,6	100	50, 0	0,5	1,5 - 2	6 bis 8
Glibornurid	1300; 2-4 h nach 25 mg	95	8	100	60 - 72, 0	0,5	2 bis 4	24
Glisoxepid	110 ; 1h nach 4 mg	93	2	50	76, 60	0,5 - 0,75	1	bis 10
Gliquidon	500 - 700; 2-3 h nach 3 mg	99	4 bis 6	100	5, 0	1 - 1,5	2 bis 3	4
Glipizid	450; 1-2 h nach 5 mg	98	2,7 bis 4	> 90	65 - 68, 3 - 10	0,5	1 bis 2	8 bis 10
Gliclazid	2000 - 4000 4 h nach 80 mg	85 - 97	12	99	60 - 70, 0	2 bis 5	4	6
Glimepirid	309; 2,5 h nach 4 mg	> 99	5 bis 8	100	58, 0	0,5	2,5	12 bis 24

Tabelle 8: Pharmakokinetik und biologisches Verhalten der Sulfonylharnstoffe [117-128]

Im Allgemeinen korreliert die biologische Wirkdauer von Sulfonylharnstoffen nicht mit ihrer Plasmahalbwertszeit. Pharmakokinetische Daten und biologisches Verhalten der Sulfonylharnstoffe sind in Tabelle 8 aufgeführt. Das Hypoglykämie-Risiko ist im Allgemeinen bei den lang wirkenden Sulfonylharnstoffen größer als bei kurz wirksamen. Aufgrund seiner hohen Lipophilie kumuliert vor allem Glibenclamid in den β -Zellen und führt vermehrt zu Hypoglykämien [129]. In einer 5-Jahresstudie betrug die Inzidenz der Hypoglykämien für Glibenclamid 8,3 %, für Glipizid 4,6 % und für Gliclazid 2,3 % [129]. Aufgrund der geringen Kontaktzeit mit dem Rezeptor treten bei Glimepirid Hypoglykämien seltener auf. Vergleichend ergaben sich Inzidenzen von 1,7 % bei Glimepirid, 2,4 % bei Glibenclamid oder 0,9 % vs. 1,2 % (gegenüber Glipizid) [119, 130]. Da die Sulfonylharnstoffe der dritten Generation fast komplett in ihrer metabolisierten Form in den Urin ausgeschieden werden (Metaboliten sind in Tabelle 9 aufgeführt), müssen analytische Methoden, die Urin als Matrix benutzen, diese Metaboliten erfassen können.

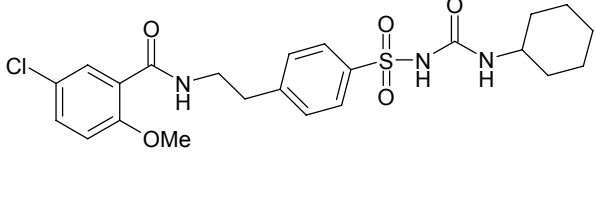
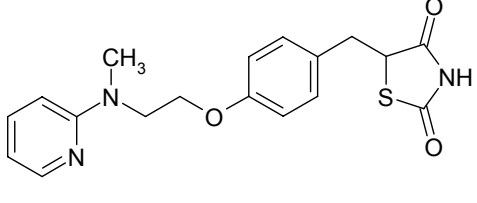
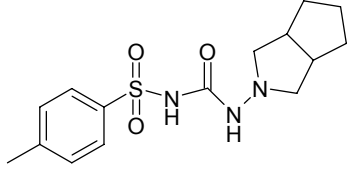
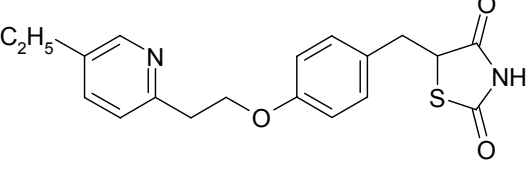
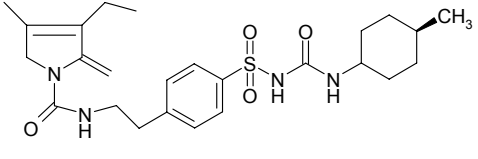
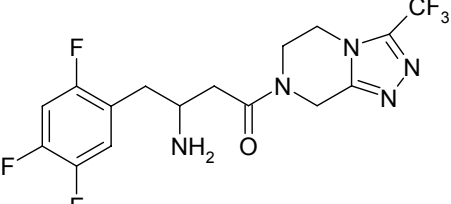
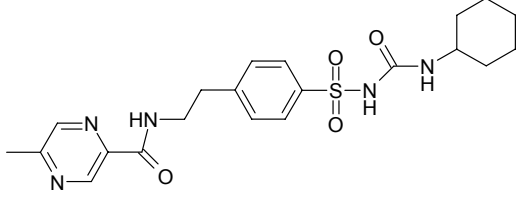
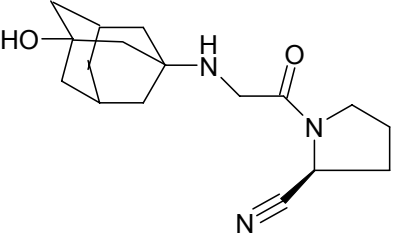
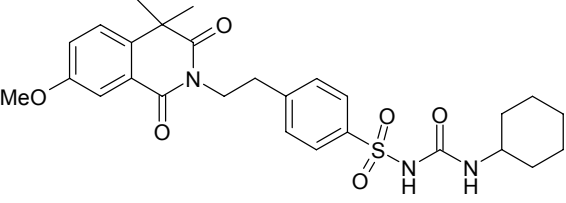
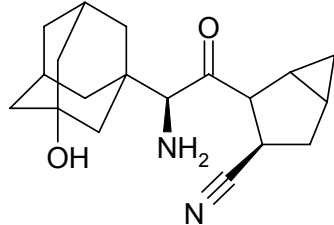
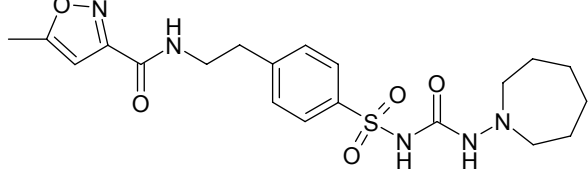
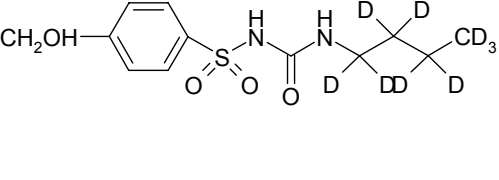
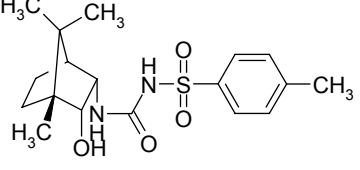
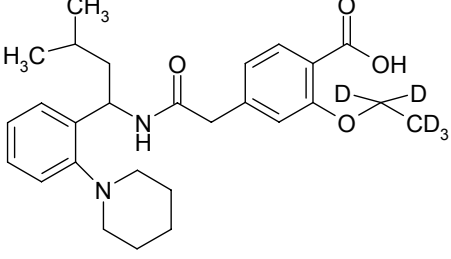
1. Einführung

Gruppe	Wirkmechanismus	Wirkstoff	Hauptmetaboliten im Urin	Hypoglykämie als Nebenwirkung
Sulfonylharnstoffe	Insulinotrope Substanzen: Blockade von Kaliumkanälen in der β -Zelle führt zu Depolarisation der Zellmembran und spannungsabhängiger Calciumkanäle. Aus der erhöhten cytosolischen Calciumkonzentration resultiert vermehrte Insulinausschüttung	Glibenclamid	Hydroxymetabolit a	ja
		Glibornurid	Hydroxymetaboliten b und c	
		Gliclazid	Hydroxymetabolit d	
		Glimepirid	Hydroxymetabolit e	
		Glipizid	Muttersubstanz und Hydroxymetabolit f	
		Gliquidon	Hydroxymetabolit g	
Glinide		Repaglinid	Muttersubstanz	ja
		Nateglinid	Muttersubstanz und	
			Hydroxymetabolit h	
Glitazone	Agonisten an nukleären peroxisome proliferator-activated receptor PPAR γ , erhöhen Insulinsensitivität der Gewebe	Pioglitazon	Hydroxymetabolit i	selten*
		Rosiglitazon	Hydroxymetabolit j und N-desmethyl hydroxymetabolit k	
Dipeptidyl	Verhindern den Abbau von Inkretinen	Sitagliptin	Muttersubstanz	selten*
Peptidase-4 Inhibitoren	- (glucagon like peptide 1 und glucose dependent insulinotropic peptide), welche Synthese und Ausschüttung von Insulin erhöhen	Vildagliptin	Muttersubstanz	
		Saxagliptin	Muttersubstanz	

a=N-(4-(b-5-Chloro-2-methoxybenzamidoethyl)benzenesulfonyl)-N'-(4-hydroxycyclohexyl)urea
b=1-[(1R)-2-endo-Hydroxy-3-endo-bornyl]-3-(p-(hydroxymethylphenyl)sulfonyl)urea
c=1-[(1R)-2-endo-Hydroxy-3-endo-hydroxybornyl]-3-(p-tolylsulfonyl)urea
d=1-(4-Hydroxymethylbenzenesulfonyl)-3-(3-azabicyclo[3.3.0]octyl)urea
e=1-[[p-[2-(3-Ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido)ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-(trans-4-hydroxymethylcyclohexyl)urea
f=1-(4-Hydroxycyclohexyl)-3-[[p-[2-(5-methylpyrazinocarboxamido)ethyl]-phenyl]sulfonyl]urea
g=1-(4-Hydroxycyclohexyl)-3-[[4-[2-(3,4-dihydro-7-methoxy-4,4-dimethyl-1,3-dioxo-2(1H)-isochinoyl)ethyl]phenyl]sulfonyl]urea
h=N-[(trans-4-isopropanoylcyclohexyl)carbonyl]-D-phenylalanine
i= 5-(4-(2-(5-Hydroxyethyl-2-pyridyl)ethoxy)benzyl)-2,4-thiazolidinedione
j=5-[[4-[2-Methyl-2-(hydroxypyridinylamino)ethoxy]phenyl]methyl]-2,4-thiazolidinedione
k=5-[[4-[2-(Hydroxypyridinylamino)ethoxy]phenyl]methyl]-2,4-thiazolidinedione

Tabelle 9: Wirkstoffgruppen, Wirkmechanismen, Wirkstoffe und Hauptmetabolite der oralen Antidiabetika (* Herstellerangaben)

1. Einführung

 <p>a</p>	 <p>k</p>
 <p>b</p>	 <p>l</p>
 <p>c</p>	 <p>m</p>
 <p>d</p>	 <p>n</p>
 <p>e</p>	 <p>o</p>
 <p>f</p>	 <p>p</p>
 <p>g</p>	 <p>q</p>

1. Einführung

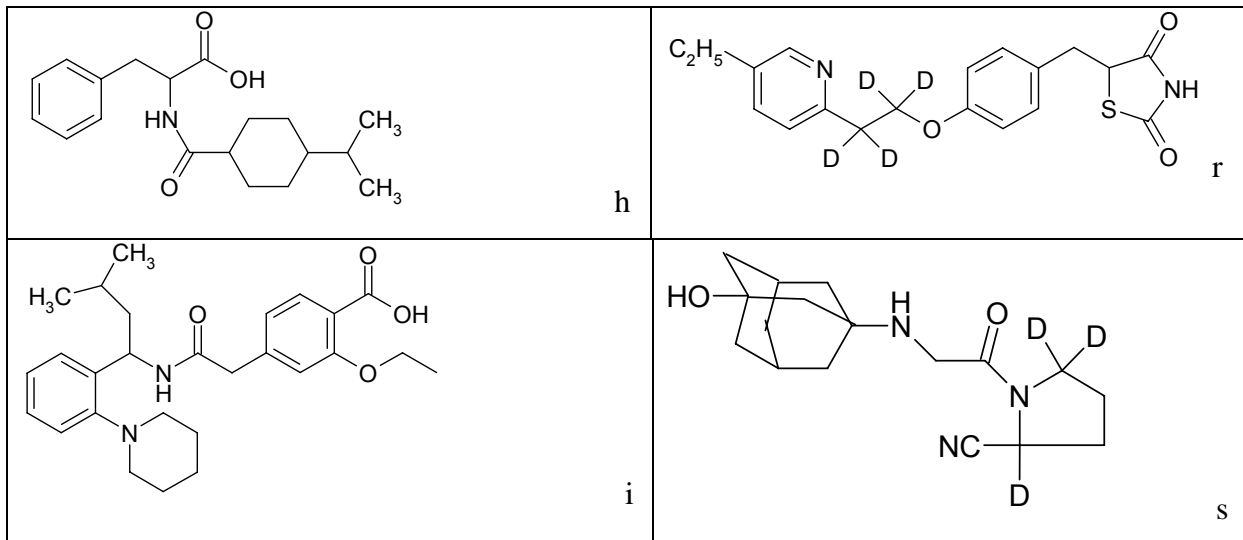


Abbildung 4 : Chemische Strukturen oraler Antidiabetika: Glibenclamid (a), Gliclazid (b), Glimepirid (c), Glipizid (d), Gliquidon (e), Glisoxepid (f), Glibornurid (g), Nateglinid (h), Repaglinid (i), Rosiglitazon (k), Pioglitazon (l), Sitagliptin (m), Vildagliptin (n), Saxagliptin (o) und die verwendeten Internen Standards Hydroxy-Tolbutamid-d₉ (p), Repaglinid-ethyl-d₅ (q), Pioglitazon-d₄ (r) und Vildagliptin-d₃ (s)

1.4.5 Methylglyoxal

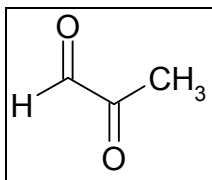


Abbildung 5: Strukturformel von Methylglyoxal

Methylglyoxal (MG, Pyruvaldehyd, 2-Oxopropanal, Acetylformaldehyd; Struktur in Abbildung 5) ist ein hochreaktives Aldehyd. Es kann aus exogenen Quellen stammen oder innerhalb des Körpers synthetisiert werden (Abbildung 6). Exogene Quellen von MG sind Regenwasser [131], Nahrungsmittel [132] und Zigarettenrauch [133]. In vivo entsteht es über einige Stoffwechselwege, unter anderem über Aminosäure-Katabolismus mittels Aminoxygenasen, Aceton-Metabolismus und Glykolyse mittels der MG Synthase [134]. Beim Aminosäureabbau von Threonin und Glycin kann aus dem Zwischenprodukt Aminoaceton [135] durch oxidative Desaminierung MG gebildet werden [136]. Weiterhin kann Aceton [137] in zwei Schritten durch die Cytochrom P450 IIE1 Isoenzyme Aceton-Monooxygenase in das Zwischenprodukt Acetol und weiter mittels der Acetol-Monooxygenase [138] in MG umgewandelt

1. Einführung

werden. Die Bildung des Ketonkörpers Aceton wird durch Diabetes induziert [139] und die Enzymkapazität der Cytochrom P450 Isoenzyme kann durch verschiedene physiologische und pathologische Umstände (z.B. Fasten oder Diabetes mellitus) induziert werden [140]. Außerdem kann MG durch spontane nichtenzymatische Eliminierung von Phosphat aus den Triosephosphaten Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) entstehen [141, 142]. Bei diesen Produkten handelt es sich um Zwischenprodukte der Glykolyse. MG kann auch enzymatisch aus DHAP durch das Enzym Methylglyoxalsynthase gebildet werden [143]. (Abbildung 6)

Unter normalen physiologischen Umständen wird die MG-Konzentration durch den Metabolismus über die Enzyme Glyoxylase I und II, die reduziertes Glutathion als Cofaktor benötigen, gering gehalten [144]. Unter hyperglykämischen Bedingungen sind die MG-Konzentrationen im Plasma erhöht. In der Literatur zeigen sich sehr unterschiedliche Angaben zu MG-Konzentrationen, die auf die unterschiedlichen Aufarbeitungsprotokolle zurückzuführen sind (Tabelle 10). MG bindet aufgrund seiner hoch elektrophilen Struktur an Sulfhydryl- und Aminogruppen von Membranproteinen und formt so Konjugate, die sogenannten „Advanced Glycation End Products“ (AGE). Dabei ist die Aldehydgruppe anfälliger für den Angriff einer anderen Gruppe als die Ketogruppe [145]. AGE sind komplexe und verschiedenartige chemische Verbindungen. Sie sind das Endprodukt der nichtenzymatischen Glykierungsreaktion (nukleophile Addition) von Carbonylgruppen reduzierender Zucker (MG) mit freien Aminogruppen von Proteinen (Maillard-Reaktion), Lipiden und Nukleinsäuren. Es entsteht eine labile Schiff'sche Base, die spontan zu einem stabileren Ketoamin (Amadori-Produkt) umgelagert werden kann [146]. Die Bildung der Schiff'schen Base ist konzentrationsabhängig. Da die Konzentration an Proteinen in vivo als nahezu konstant angesehen werden kann, ist die Konzentration an reduzierenden Zuckern der reaktionsbestimmende Faktor. Diabetische Hyperglykämie ist damit reaktionsfördernd. Für MG treten die in Abbildung 7 dargestellten Modifikationen von Proteinen vor allem an Arginin- und Lysinresten auf [139]. AGE modifizieren Membranfunktionen, was zu vaskulären diabetischen Komplikationen, erhöhtem Bluthochdruck im Tiermodell, zu oxidativem Stress, Arteriosklerose oder Alzheimer führt [147, 148].

1. Einführung

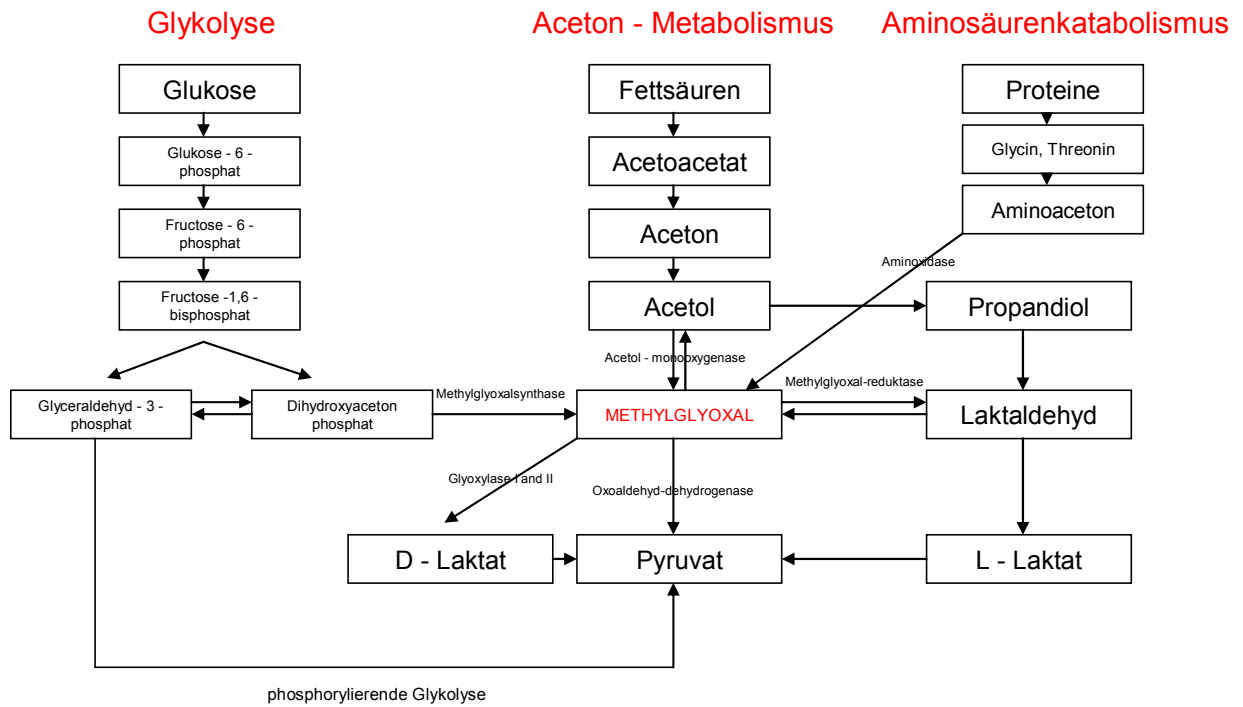


Abbildung 6: Synthese und Metabolismus von MG

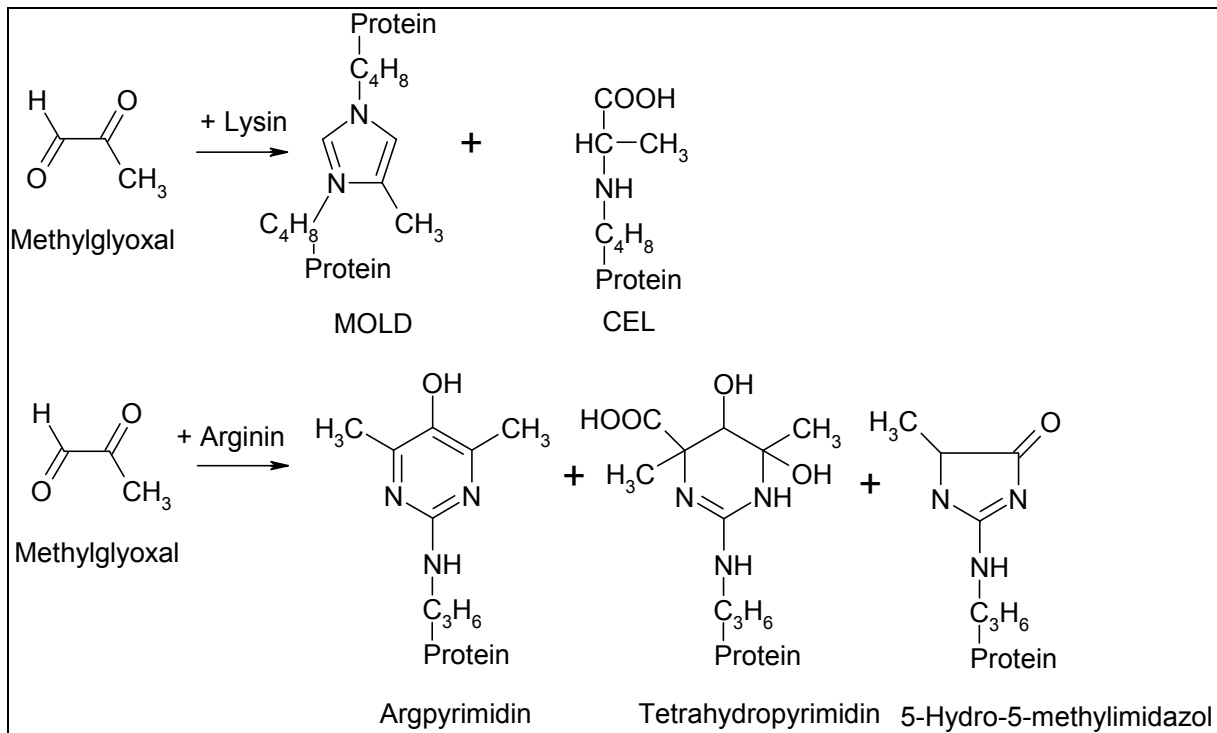


Abbildung 7: Bildung von verschiedenen AGEs durch Reaktion von MG mit Lysin- und Argininresten von Proteinen [149]; MOLD: MG-Lysin-Dimer (1,3-di(Nε-lysino)-4-methyl-imidazolium und CEL: Nδ-1-Carboxyethyllysine

1. Einführung

		[156]	[150]	[151]	[152]	[153]	[154]	[155]
Typ Diabetiker	1	33,87 (6,19 - 75,25) ng/ml (n=43)	13,6 ± 2,78 ng/ml	158 ± 46 ng/ml (n=20)	60,65 ± 17 ng/ml (n=56)	34,52 ± 3,5 ng/ml (n=55)		259,4 ± 165,7 ng/ml (n=85)
Typ Diabetiker	2	20,66 (3,9 - 170,78) ng/ml (n= 107)	13,6 ± 27,8 ng/ml	158 ± 46 ng/ml (n=20)	60,65 ± 17 ng/ml (n=56)	34,52 ± 3,5 ng/ml (n=55)		259,4 ± 165,7 ng/ml (n=85)
Nicht - Diabetiker		5,75 (1,82 - 64,34) ng/ml (n=21)	8,86 ± 2,66 ng/ml	Normal: 47 ± 12 ng/ml (n=15)	31,648 ± 6,49 ng/ml (n=18)	18,45 ± 6,6 ng/ml (n=12)	Im Bereich von 720 ng/ml	100,8 ± 14,4 ng/ml (n=45)

Tabelle 10: Referenzkonzentrationen für MG in der Literatur

1.4.6 Anhydroglucitol

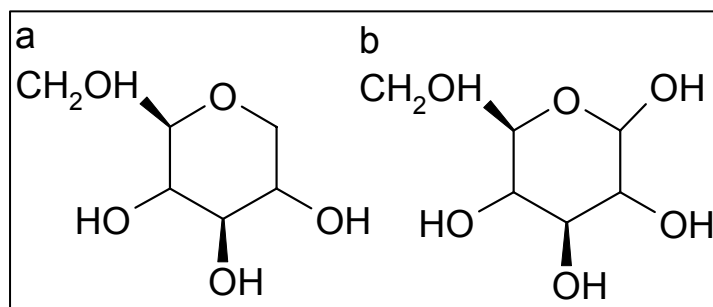


Abbildung 8: Strukturformel von AG (a). Im Vergleich zu Glucose (b) fehlt die Hydroxygruppe in Position 1.

1,5-Anhydroglucitol (AG, Abbildung 8), die 1-Deoxy-Form von Glucose, wird über die Nahrung aufgenommen und konkurriert mit Glucose um die Reabsorption über den spezifischen Transporter SGLT4 (sodium dependent glucose transporter) in der Niere[157]. Normale Plasma-AG-Konzentrationen können während hyperglykämischen Phasen aufgrund der Hemmung der normalerweise hohen (> 99 %) tubulären Reabsorption dramatisch erniedrigt sein. Bei Normoglykämie bleibt AG aufgrund der im Vergleich zu der Nahrungseinnahme großen Körperreserve und aufgrund des fehlenden Metabolismus bei konstanten Steady State Konzentrationen [157]. Wenn die Blutglucosekonzentration die renale Schwelle für Glucose von 180 mg/dl übersteigt, fällt die Konzentration von AG in enger Beziehung zum Ausmaß der Glucosurie [158]. Daher zeigen Patienten mit Diabetes signifikant niedrigere AG-Serumkonzentrationen als Nicht-Diabetiker [158, 159]. Es wurde gezeigt, dass die Messung von AG eine Alternative zur Bestimmung des HbA1c darstellt, da es schnelle Veränderungen im glykämischen Status, vor allem postprandiale Hyperglykämien, genauer prognostizieren kann als HbA1c oder

1. Einführung

Fructosamin [159]. Referenzkonzentrationen für AG werden im Mikrogramm pro Milliliter-Bereich für Nicht-Diabetiker beschrieben ($26,6 \pm 7,2 \mu\text{g/ml}$ bei Männern, $21,5 \pm 6,0 \mu\text{g/ml}$ bei Frauen [160]). Diabetiker gelten mit AG-Konzentrationen zwischen 10 und $13,9 \mu\text{g/ml}$ als exzellent, zwischen $6,0$ und $9,9 \mu\text{g/ml}$ als gut und bei $< 6 \mu\text{g/ml}$ als schlecht eingestellt [160].

1.4.7 Ketonkörper

Die diabetische Ketoazidose stellt einen medizinischen Notfall dar und wird zunächst durch eine erhöhte Ketonkörperproduktion (Aceton, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat) gekennzeichnet [161]. Die Produktion dieser Ketonkörper wird von einer äquimolaren Menge von Wasserstoffionen begleitet und verursacht daher eine Azidose [162]. Die Hauptketonkörper β -Hydroxybutyrat ($27\text{-}86 \mu\text{mol/l}$ nüchtern und $11\text{-}31 \mu\text{mol/l}$ postprandial [163]) und Acetoacetat ($28\text{-}203 \mu\text{mol/l}$ [73]) sind im Blut normalerweise in äquimolaren Mengen aufzufinden. Aceton, normal nur in geringen Konzentrationen aufzufinden ($0,8\text{-}2,4 \text{ mg/l}$ [164]), wird durch spontane Decarboxylierung aus Acetoacetat gebildet. Die Konzentrationen unterscheiden sich kaum zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Patienten. Das Verhältnis Acetoacetat zu β -Hydroxybutyrat ist eng mit dem NAD^+/NADH -Verhältnis der Lebermitochondrien verknüpft und Änderungen in diesem Verhältnis spiegeln den pathophysiologischen Status der Leber wider. Jeder Zustand, der den Redoxstatus der hepatischen Mitochondrien verändert, indem er die NADH-Konzentrationen erhöht (Hypoxie, nüchterner Status, diabetische Stoffwechsellentgleisungen wie Hypoglykämie und Ketoazidose, alkoholische Ketoazidose, Lebererkrankungen, hepatische Ischämie, generell oxidativer Stress), verschiebt das Gleichgewicht zwischen Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat zugunsten des β -Hydroxybutyrats. β -Hydroxybutyrat macht dann ungefähr 75 % der Gesamtketonkörper aus [165]. Daher muss β -Hydroxybutyrat in die analytischen Methoden mit aufgenommen werden [73]. Eine Acetonkonzentration $> 21 \text{ mg/l}$ spricht für eine diabetische Ketoazidose [166], in diesen Fällen wurden Acetonkonzentrationen im FVB von $0\text{-}2900 \text{ mg/l}$ [167], $50\text{-}800 \text{ mg/l}$ [168] und $146\text{-}748 \text{ mg/l}$ [168] beobachtet.

1. Einführung

1.5 Analytik

1.5.1 Glucose und Laktat

Die Präanalytik ist aufgrund fehlender Stabilität des Analyts Glucose von enormer Wichtigkeit: Empfohlen wird der Zusatz von Glykolyse-Inhibitoren wie Natriumfluorid (2,5 g/l oder 4,3 g/l Natriumfluorid und Calciumoxalat als Antikoagulans [169]), Maleinimid, Lithiumiodacetat oder Mannose (2 g/l) [58, 170] zur Stabilitätserhöhung. Die Glucosekonzentration ist in diesen Behältnissen dann für 12 Stunden bei Raumtemperatur, für 2 [171] bis 6 Tage [172] bei 4°C und einige Monate [172] bei -20°C konstant. Im Lebenden sollte Blut aus Arterien zur Glucosemessung herangezogen werden. Leider wird häufig auf venöses oder Kapillarblut zurückgegriffen. Im nüchternen Zustand ist dies kein Problem, da die Glucosekonzentration dann in arteriellem wie in venösem Blut ähnliche Werte aufweist. Im postprandialen Zustand ist die arterielle Konzentration aber um ca. 36-54 mg/dl höher als die venöse. Laktatkonzentrationen sind dagegen im venösen Blut um 20% höher [58].

Die empfohlene Referenzmethode zur Bestimmung von Glucose ist die Hexokinase-glucose-6-phosphatase Technik. Weitere Methoden sind die Glucoseoxidase- oder die Glucosedehydrogenase-Methode [58]. Für die Laktatbestimmung wird meistens die Reaktion mit dem Enzym Laktatdehydrogenase erfasst, wobei die Produktion von NADH₂ photometrisch gemessen wird [58]. Ebenso besteht die Möglichkeit der enzymatischen Umsetzung mit der Laktatperoxidase [173].

1.5.2 Glykierte Proteine

Bei den meisten Methoden wird HbA1c quantifiziert, bei anderen das "gesamte glykierte Hämoglobin", welches sowohl HbA1c als auch weitere Hämoglobin-Glucose-Addukte beinhaltet. Eine Referenzmethode zur Bestimmung des HbA1c wurde entwickelt [174], um eine einheitliche Normierung der HbA1c-Messung zu erreichen. In dieser Methode wird Hämoglobin in einem ersten Schritt mittels des Enzyms Endoproteinase Glu-C in Peptide gespalten, in einem zweiten Schritt werden die erhaltenen glykierten und nicht-glykierten N-terminalen Hexapeptide der β -Kette per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) getrennt und mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) quantifiziert. Der HbA1c ist bei 4°C für

1. Einführung

mindestens 40 Tage [175], in Behältnissen mit Natriumfluorid für 3 Monate und in Behältnissen mit Heparin für 6 Monate konstant [176].

Die verbreitetste Methode zur Bestimmung des Fructosamins beruht auf der Fähigkeit von Ketoaminen, NBT (nitroblue tetrazolium) bei pH 10,35 zu Formazan zu reduzieren [65]. Seit der ersten Beschreibung dieses Tests gab es einige Berichte über Störungen und Verbesserungen (zusammengefasst in [165]). Eine Hyperproteinämie kann zu falsch erhöhten, eine Hypoproteinämie zu falsch erniedrigten Resultaten führen [165]. Serum für die Fructosamin-Bestimmung kann für 24 h bei Raumtemperatur [177], für zwei Wochen bei 4°C [177] und für einige Monate bei -20°C [65] gelagert werden.

1.5.3 Humanes Insulin

Bei der Präanalytik sind vor allem die Störungen der Insulinalalytik wie Hämolyse und die Stabilität des Insulins zu beachten. O'Rahilly zeigte, dass nur schwach ausgeprägte Hämolyse einen merklichen Effekt auf die Insulinkonzentration im Plasma hat [178]. Das insulin-degrading enzyme (IDE), eine peroxisomale Protease [179], ist in diversen Geweben anzutreffen, unter anderem in den roten Blutkörperchen und besonders im Hämolysat [180]. Eine schnelle Trennung des Serums, Lagerung bei niedriger Temperatur und der Zusatz von IDE-Inhibitoren können dem entgegenwirken. Die effektivsten Inhibitoren sind Sulfhydrylgruppen-modifizierende Agenzien wie Diamid, p-Hydroxymercuribenzoat (1 mmol/l) [181] und p-Chloro-mercuriphenylsulphonsäure (100 mg/l) [80, 178, 182]. N-Ethyl-maleimid (1 mmol/l) erwies sich als effektiver Inhibitor [183], es mangelte allerdings an Löslichkeit in Wasser [182]. Insulinkonzentrationen sind bei 4°C bis zu 5 Tage [184], bei -20°C für einige Monate stabil. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen hatte keinen Einfluss auf die gemessene Konzentration [185-187].

Normalerweise werden zur Routinemessung von Insulin verschiedene Arten Immunoassays genutzt (zusammengefasst in [74, 81]). Doch Proinsulin und weitere Proinsulin-ähnliche Moleküle (und Anti-Insulin Antikörper) in humanem Plasma machen 10-20 % und bei Diabetikern sogar mehr als 20% der Immunogenität der Insulin-ähnlichen Moleküle aus [95, 188, 189]. Daher muss die Spezifität dieser Immunoassays stark in Frage gestellt werden. Die Kreuzreaktivität variiert von 40-100%, je nach benutztem polyklonalen Antikörper, Probenverdünnung, Inkubationszeit und Inkubationstemperatur [80]. Weitere potentielle Assayprobleme

1. Einführung

sind Sensitivität, Standardisierung und Referenzkonzentrationen [190-192]. Weiterhin können kommerziell erhältliche Immunoassays, die für die Bestimmung von humanem Insulin entworfen wurden, synthetische Insuline nur teilweise oder gar nicht erfassen und führen so zu falschen Ergebnissen, auch wenn inzwischen schon verbesserte Immunoassays erarbeitet wurden [193, 194]. Für forensische Zwecke wären massenspektrometrische Methoden vonnöten. In der Dopinganalytik wurde eine Methodik veröffentlicht, mit der ein eindeutiger Nachweis von humanem Insulin und synthetischen Insulinanaloga und Metaboliten in Urin- und Plasmaproben gelingt [195].

1.5.4 C-Peptid

Blut für die C-Peptid-Analytik sollte in Röhrchen mit Heparin gesammelt werden, während EDTA nicht zu gebrauchen ist [196]. Serum sollte von Blutbestandteilen so schnell wie möglich getrennt und sofort bei -20°C gelagert werden. Dann ist die C-Peptidkonzentration für 40 Tage stabil [197]. Ansonsten wird das C-Peptid schnell abgebaut [198]. Die gesamte Plastik- und Glasware, die in Kontakt mit C-Peptidhaltigen Lösungen (auch Matrixlösungen) steht, sollte mit einer 1%igen Serumalbuminlösung versetzt sein [194], da das Peptid sehr leicht an Glasoberflächen adsorbiert und sich so einer Messung entzieht. Eine weitere Möglichkeit, dem entgegenzuwirken, ist die Nutzung sogenannter „low protein-bind polypropylen“-Röhrchen [199]. Die Herausforderung bei der C-Peptid-Messung liegt nicht unbedingt in der Sensitivität der analytischen Methode, sondern vor allem in der Präanalytik und Probenvorbereitung [200]. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen scheinen variable oder keine Effekte auf die gemessene C-Peptidkonzentration zu haben [81].

Immunoassays für die Analyse des C-Peptids in Plasma sind etabliert (Zusammenfassung in [98, 201, 202]). Da das C-Peptid jedoch ein relativ kleines Peptid ist, ist seine Antigenität und dadurch die Spezifität von Immunoassays gering. Es besteht ein Mangel an Übereinstimmung zwischen RIA und ELISA und auch verschiedenen RIAs [98, 203], der auf die unterschiedlichen Antikörperspezifitäten oder Matrixeffekte zurückzuführen sein könnte. In vergleichenden Studien ergaben Immunoassays häufig übereinstimmend höhere Ergebnisse als massenspektrometrische Methoden [204]. Zur C-Peptid-Immunoreaktivität könnten katabolische Produkte des C-Peptids mit einer erhöhten Halbwertszeit beitragen.

1. Einführung

Alternativen zu Immunoassays in forensischen Laboren stellen LC-MS/(MS)-Methoden nach Ultrafiltration des Urins [98, 203, 205] oder nach SPE [203] und anschließender positiver [204, 205] oder negativer Ionisation [179, 206] dar.

1.5.5 Proinsulin

Da die IDE nur eine geringe Aktivität gegenüber Proinsulin aufweist [200], ist das Proinsulin in Serum relativ stabil. Keine Effekte zeigten wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen [81]. Proinsulin wird meistens mittels immunologischer Verfahren bestimmt (Zusammenfassung in [207]). Indirekte RIA, die auf einer Trennung des Proinsulins von Insulin und C-Peptid vor der Analyse basieren [92, 208, 209] oder direkte RIA, die polyklonale Antikörper gegen Proinsulin benutzen [210, 211], wurden beschrieben. Auch diese mussten sich Kritik stellen, da sie nicht zwischen intaktem Proinsulin und Zwischenstufen unterscheiden können [212-215]. Vor allem die Kreuzreaktivität zu Des64,65-Proinsulin und gespaltenem 65/66-Proinsulin ist problematisch. In der Literatur wird keine massenspektrometrische Methode beschrieben, auch weil eine Referenzsubstanz nicht erhältlich ist.

1.5.6 Orale Antidiabetika

Analytische Methoden zur Bestimmung einzelner Sulfonylharnstoffe basieren auf GC- oder HPLC-Trennung [216, 217] oder mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatographie mit Diodenarray- oder UV-Detektion [218]. Die ESI-LC-MS-Analytik von 4 Sulfonylharnstoffen im Serum [219] oder APCI (Atmospheric pressure chemical ionization)-LC-MS [220] zur Bestimmung aller Sulfonylharnstoffe wurde beschrieben. Zwei Publikationen zeigten erfolgreiche simultane Nachweise von Sulfonylharnstoffen, Gliniden und Glitazonen in Pferdeplasma [221] und humanem Urin [222].

1.5.7 Methylglyoxal

Eine verlässliche Quantifizierung von MG von Probe zu Probe fällt schwer. Die direkte quantitative Messung von MG wird durch die hohe Reaktivität erschwert. Zur Quantifizierung von freiem bzw. reversibel gebundenem MG werden daher Derivatisierungsmittel verwendet, die eine weitere Reaktion verhindern. Als Derivatisierungsreagenz dienen o-Phenylendiamin [156], Dichloro-1,2-phenylendiamin, 4,5-Methylendioxy-1,2-phenylendiamin [223],

1. Einführung

o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin HCl (PFBOA) [224], Dinitrophenylhydrazin [225] oder 9-(3,4-diaminophenyl)acridin [223, 226]. Die entstehenden Chinoxaline können über HPLC oder GC [156] nachgewiesen werden. Chinoxaline besitzen konjugierte Doppelbindungen und sind Fluorophore [227]. Es wurde auch eine GC-Methode ohne Derivatisierung beschrieben [159].

1.5.8 Anhydroglucitol

Es sind zwei enzymatische Assays zur Bestimmung von AG in klinischen Serumproben kommerziell erhältlich, der GlykoMark[®] Test [160] und der Determiner-L-1,5-AG[®] (Kyowa Medex, Japan) [228], die bei vergleichenden Untersuchungen ähnliche Ergebnisse lieferten [160]. Bei diesen Tests wird nach Oxidation des AG zu 1,5-Anhydrofructose durch die Pyranoseoxidase ein Wasserstoffperoxid-Reaktionsprodukt mit einem Standard-Peroxidase-Assay kolorimetrisch vermessen. Da Glucose ebenfalls durch die Pyranoseoxidase oxidiert wird, kann sie die Messung stören. Daher wird die Probe zunächst mit Glucosekinase versetzt, die Glucose zu Glucose-6-phosphat umwandelt. Obwohl diese Tests sehr sensitiv und robust sind, wurden Interferenzen mit Glucose, Bilirubin, Hämoglobin [229], Maltose [230] oder Myo-Inositol [231] beschrieben. Um dies zu umgehen, nutzten Tanabe et al. [232] ein "Flow-Injektions"-System, in dem diese interferierenden Substanzen durch eine online Anionenaustauschersäule vor der Enzymreaktion adsorbiert wurden.

Weiterhin wurde eine HPLC-Methode mit gepulster amperometrischer Detektion nach Passieren der Probe durch eine 2- oder 3- schichtige Anionenaustauschersäule beschrieben [233]. Eine fluorometrische Methode nach Derivatisierung mit Benzoesäure wurde ebenfalls beschrieben [157, 234]. Auch massenspektrometrische Methoden wurden genutzt: GC-MS [235, 236] ebenso wie LC-MS-Methoden, die AG im negativen Ionisierungsmodus [235] mit ESI [230, 236] oder APCI [235] nach Trennung aufgrund der polaren Eigenschaften des AG über eine polare Säule erfassten (Amidphase [236], hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mit einer Amino-Säule [230] oder ein sulfoniertes Styren-Divinylbenzen Copolymer mit Zinkionen [237, 238]).

1.5.9 Ketonkörper

Für klinische Fragestellungen wird meistens die eine lila Farbe produzierende Reaktion zwischen Ketonen und Nitroprussid photometrisch beobachtet [239]. Diese Methode ist in Form von Vorteststicks und Tabletten kommerziell erhältlich

1. Einführung

(Ketostix®, Acetest®) und eignet sich zur Analyse von Ketonkörpern in Blut und Urin [240]. Diese Nitroprussid-Methode misst allerdings nur Acetoacetat [241], es sei denn, die Reagenzien enthalten Glycin. In diesem Fall wird Aceton ebenfalls erfasst [71]. Die American Diabetes Association empfahl für die Routinebestimmung von Hydroxybutyrat [162] eine enzymatische Methode, während der das aus NAD produzierte NADH photometrisch erfasst werden kann. In der forensischen Praxis sollte die Head-Space gaschromatographische Methodik nach Felby et al. [242] benutzt werden. Die Methode beruht auf der Umwandlung von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat in Aceton und anschließender Bestimmung des Acetons mittels Headspace-Gaschromatographie. Weitere beschriebene Methoden, die forensischen Ansprüchen genügen, sind GC/MS-Techniken nach Derivatisierung mit TBDMS [243-245] oder noch besser ESI-MS [246].

Für die Ketonkörperbestimmung kann sowohl zentrales venöses Blut als auch arterielles Blut genommen werden [247]. Bei 4°C sind die Ketonkörper für mindestens 24 h stabil [247]. β -Hydroxybutyrat ist für mindestens zwei Tage im Blut stabil [248]. Acetoacetat dagegen ist weniger stabil und unterliegt einer nicht-enzymatischen Decarboxylierung zu Aceton [249]. Proben sollten bei -20°C gelagert werden.

1.6 Nachweis von Glucosestoffwechselentgleisungen im Lebenden bei forensischen Fragestellungen

Blut- oder Serumglucose wird bei forensischen Fragestellungen normalerweise nur bei absolutem Verdacht auf eine Hypoglykämie am Tat- bzw. Unfallort direkt mittels eines tragbaren Glucosemeters gemessen. Ein solcher Fingerkuppentest dient nur als klinischer Anhaltspunkt und ist in forensisch relevanten Fällen unzuverlässig. Die Aufnahme von Nahrung oder schnell resorbierbaren Kohlenhydraten oder die intravenöse Zufuhr von Glucose durch einen Arzt am Ort des Vorfalls, die Einnahme anderer Medikamente oder der totale Verlust der Inselzellfunktion, wie er in manchen Fällen mit akuter Pankreatitis oder Trauma zu beobachten ist [250], können eine Verfälschung der aktuellen glykämischen Situation darstellen und müssen beachtet werden. Weiterhin kann eine Erhöhung der Glucosekonzentration durchaus durch eine „Alarmreaktion“ des Körpers im Todeskampf in Assoziation mit einer erhöhten

1. Einführung

Ausschüttung von Catecholaminen zustande kommen [251]. Die Gabe von Adrenalin zur Unterstützung von Wiederbelebensmaßnahmen kann außerdem die Glykogenmobilisierung fördern, während Wiederbelebensmaßnahmen das mobilisierte Glykogen und Glucose durch die Zirkulation pumpen können [252]. Weiterhin können Hypoglykämien sich auch von selbst ohne die Zufuhr von Zucker korrigieren [114]. Daher sollte beim Lebenden alles dafür getan werden, genug Blut während der mutmaßlich hypo- (oder hyper)glykämischen Episode zu sammeln. Bei Verkehrsunfällen wird leider häufig Glucose gar nicht bzw. viel zu spät gemessen. Einerseits werden Blutproben 1-2 h nach einem Verkehrsunfall von den örtlichen Behörden genommen, andererseits sinkt die Glucosekonzentration mit dem Moment der Abnahme stetig ab. Die Glykolyse baut Glucose bei fehlendem Zusatz von Glykolyseinhibitoren anaerob mit einer Geschwindigkeit von bis zu 13 mg/dl/h zu Laktat ab, sodass die gesamte Blutglucose abhängig von der Temperatur in 6-8 h abgebaut ist [253].

Neben dem Nachweis der Hypoglykämie kann anschließend auch die Ursache mittels analytischer Methoden aufgeklärt werden. Dafür sollten orale Antidiabetika, synthetische Insuline, humanes Insulin und das C-Peptid bestimmt werden. Bei Verdacht auf Injektion von humanem Insulin ist die C-Peptid-Analytik unablässig. In klinischen Proben kann laut immunchemischen Messungen I:C zwischen einer exogenen Humaninsulingabe (I:C>1, hohe Insulinkonzentration und niedrige C-Peptid-Konzentration) und einer durch ein Insulinom (I:C<1, wie gesunde Menschen) oder einer Überdosierung mit oralen Antidiabetika (hohe Insulin- und hohe C-Peptidkonzentrationen) ausgelösten Hypoglykämie unterscheiden [166].

1.7 Nachweis von Glucosestoffwechselentgleisungen post mortem

Nach dem Tod hat die Blutglucosekonzentration kaum noch Aussagekraft. Diese verhält sich im toten Körper genau wie nach Abnahme aus einem lebenden Menschen: Der maximale Wert im Moment des Todes sinkt rapide ab (ca. 13 mg/dl pro Stunde [166]), sodass sich aus der absoluten Glucosekonzentration kein Hinweis auf die Konzentration zum Zeitpunkt des Todes ergibt. Daraus resultierend steigen die Laktatkonzentrationen bis zu zehn Stunden nach dem Tod mit einer Geschwindigkeit von 10-15 mg/dl/h an [254]. Neben Blut werden in der

1. Einführung

Forensik daher häufig die Matrices Glaskörperflüssigkeit (GKF) und Liquor cerebrospinalis (CSF) zur Analyse herangezogen. Die Glucosekonzentrationen in der GKF korrelieren gut mit der Blutglucose vor dem Tod [255] und betragen ca. 50 % [256] bis 85 % [257] der ante mortem Blutkonzentrationen. Die GKF ist weniger bakterieller Kontamination, Autolyse, biochemischen Fäulnisprozessen wie z.B. einer Glykolyse ausgesetzt. Ein Nachteil ist das geringe Volumen der GKF. Trotzdem hat die Glykolyse Einfluss (stündliche Abnahme von 35-70 % in den ersten 6 Stunden nach dem Tod bei Raumtemperatur) auf die Glucosekonzentration in der GKF [73] und in der CSF (5 mg/dl/h normal und 45 mg/dl/h bei Todesursache diabetisches Koma [258]). Nach dem anfänglichen Abfall der Glucosekonzentration bleibt sie dann für einige Tage stabil [259]. Im Gegensatz dazu steigt die Laktatkonzentration weiter leicht an.

Neben der Glucosekonzentration allein kann auch die Addition der Glucose- und Laktatkonzentration in der GKF bzw. im Liquor [260] in mg/dl weiterhelfen [258]. Diese sogenannte „Summenformel nach Traub“ kann zur Diagnose einer Hyperglykämie herangezogen werden (siehe Tabelle 11), gibt aber laut Zilg et al. keine weiteren Hinweise als die Glucosekonzentration alleine [114]. Aufgrund der steigenden Laktatkonzentration zeigten einige Studien einen Anstieg der Summenformel bis 30 Stunden [261, 262] oder 2 Tage nach dem Tod [114]. Nach diesem Intervall bleibt sie für ca. 1 Woche stabil [263]. Bei der Benutzung der Summenformel sollte daran gedacht werden, dass Laktat in vivo auch bei malignen Tumoren, chronischen Entzündungserkrankungen, Urämie, Ateminsuffizienz, entzündlichen Erkrankungen des ZNS, Fasten oder Alkoholismus vermehrt gebildet wird [258, 262, 264]. Einige Autoren [254, 256] zeigten, dass die Benutzung der Summenformel zu einer Überschätzung der Hyperglykämie-Fälle führen kann und die Glucosekonzentration alleine in der GKF zur Diagnose besser geeignet ist.

Die Glucosekonzentration im Urin ist weniger verlässlich. Glucose wird in den Nierentubuli rückresorbiert. Obwohl Glucose im Urin von Patienten mit erhöhter Blutglucosekonzentration detektierbar ist (> 30 mg/dl bei Diabetikern, < 15 mg/dl bei Nicht-Diabetikern), gibt es keinen Hinweis über die aktuelle Blutglucosekonzentration unter der sehr variablen renalen Glucoseschwelle (ungefähr 180 mg/dl) [9, 73]. Das bedeutet, dass man im Falle einer negativen Uringlucose nicht zwischen einer Hypoglykämie, Euglykämie oder einer milden oder mäßigen Hyperglykämie unterscheiden kann. Während diabetischer Komata wurden Werte > 500 mg/dl

1. Einführung

beobachtet (Mittel 1549 mg/dl) [265]. Urinkonzentrationen > 100 mg/dl geben einen Hinweis auf abnormale Blutglucosekonzentrationen [266]. Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Urin kann nur als Plausibilitätskontrolle dienen, um sich einer Hyperglykämie zu versichern.

	Glucose in GKF [mg/dl]	Glucose in CSF [mg/dl]	Laktat in GKF [mg/dl]	Laktat in CSF [mg/dl]	Summenformel in GKF [mg/dl]	Summenformel in CSF [mg/dl]
Nicht-Diabetiker	30-80 [80] 3-60 [70, 267] 0-75 [167] 0-108 [268]	40-70 [70]	20,5-211,3 [268] 10,8-210,6 [58]	10-19 [70]	31-508 [167] 30,5-211,3 [268] 46-236 [254, 256]	
Diabetiker	MW 90 [70] 2-674 [267] 3-872 [256] > 200 [167] 191-1100 [268] 0,9- 668 [70]		51,5-207,7 [167] 63-331 [268] 54-207 [70]		79-830 [268] 108-973 [167] 323-1400 [269, 270]	
Grenzwerte für eine tödliche Hyperglykämie	> 300 [261]	> 200 [90]			> 410 [271] > 427 [272] > 450 [273] > 650 [260]	>362 [272] >400 [73] >415 [271] >422 [273] >500 [9]

Tabelle 11: Glucose- und Laktatkonzentrationen post mortem

Auch die Bestimmung des HbA1c ist von einiger Bedeutung in der post mortem Diagnose eines tödlichen diabetischen Komas, da es für einige Wochen nach dem Tod stabil [73, 274] und von einer Hämolyse verschont bleibt [175]. HbA1c-Konzentrationen von Diabetikern post mortem liegen bei 8,7-15,4% [266, 275] bzw. 7,5-19,6% [274] und entsprechen so den Konzentrationen lebender Diabetiker. Erhöhte HbA1c-Konzentrationen (> 10%) korrelieren mit der Summenformel nach Traub im Liquor [72]. Umgekehrt ist das allerdings nicht der Fall. Für die post mortem Analytik erweist sich HbA1c als leicht handzuhaben: Es wurden keine oder nur geringe Unterschiede zwischen den Probeentnahmeorten am Körper gezeigt (rechtes oder linkes Herzblut, Femoralvenenblut) [275]. Winecker et al. [72] zeigten keinen Einfluss der Lagerung (EDTA/NaF) auf die HbA1c-Konzentrationen. Die HbA1c-Konzentration stellt aber nur einen Hinweis auf die längerfristige Einstellung des glykämischen Status dar.

Ein weiterer Parameter, um auf die glykämische Einstellung des Verstorbenen in den Wochen vor dem Tod zu schließen, ist das Fructosamin. Fructosamin-

1. Einführung

Konzentrationen zeigen bis 72 Stunden nach dem Tod keine signifikanten Änderungen [276-278]. Einige Studien zeigten, dass die Fructosaminkonzentrationen im Blut bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern um das Doppelte erhöht sind [72]. Post mortem wurden keine Unterschiede zwischen den Probeentnahmeorten am Körper (rechtes oder linkes Herzblut, Femoralvenenblut) für Fructosamin gezeigt [268]. Auch der Nutzen einer Fructosaminbestimmung in der GKF konnte nachgewiesen werden. Nicht-Diabetiker zeigten Konzentrationen zwischen 0 und 1300 $\mu\text{mol/l}$ (MW 200 $\mu\text{mol/l}$; [70, 267]) oder im Mittel 500 $\mu\text{mol/l}$ [268], während Diabetiker Fructosaminkonzentrationen von 0-590 $\mu\text{mol/l}$ (MW 800 $\mu\text{mol/l}$; [70, 267]) oder im Mittel 1500 $\mu\text{mol/l}$ [70, 267] in der GKF aufwiesen. Osuna et al. [109] beobachteten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen GKF-Fructosamin und der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen in Fällen von diabetischer Ketoazidose.

Für den Nachweis einer Hypoglykämie stehen neben der Summenformel nach Traub vor allem der Nachweis der Ursache der Hypoglykämie durch Analytik von synthetischen Insulinen, humanem Insulin, oralen Antidiabetika und C-Peptid zur Verfügung. Forensische Wissenschaftler berichteten jedoch von einer hohen Varianz von Insulinkonzentrationen post mortem [85]. Nach Iwase et al. [109, 279] sinken die Insulinkonzentrationen nach dem Tod stark ab. In Leichenfällen wurden mittels RIA erhebliche Unterschiede in den Insulinkonzentrationen zwischen verschiedenen Herzseiten festgestellt [269, 280]. In Blut aus dem rechten Herzkreislauf wurden 10fach erhöhte Insulinkonzentration im Vergleich zum linken Herzkreislauf gemessen, was wahrscheinlich einer postmortalen Diffusion von Insulin via der Pfortader geschuldet ist [109]. Die Messung sollte daher in peripherem venösen (Femoralblut oder iliakal) Blut durchgeführt werden [281]. Merklich erhöhte Humaninsulinkonzentrationen $> 1000 \mu\text{U/ml}$ sollten den Verdacht auf eine Insulinüberdosis lenken, da diese nur sehr selten in Patienten mit Insulinsezernierenden Tumoren zu finden sind.

1.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse im Hochvakuum dar.

1. Einführung

1.8.1 Elektrospray-Ionisation

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der aus der gelösten Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird. Eine Möglichkeit der Generierung dieser Ionen ist die Elektrospray-Ionisation (ESI). Der Begriff Elektrospray beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine geladene Tröpfchen in einem elektrostatischen Feld. Mit zunehmender Verdampfung des Lösungsmittels erhöht sich die Ladungsdichte auf der Tropfenoberfläche, die Ladung verbleibt auf den ionisierten Makromolekülen. Beim Transfer der Analytmoleküle ins Massenspektrometer werden diese desolvatisiert. Dabei beginnt der ESI-Prozess mit der kontinuierlichen Zuführung des gelösten Analyten an die Spitze einer leitfähigen Kapillare. Das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer durchdringt auch die Analytlösung und trennt die Ionen. Dabei werden im positiven Modus die positiven Ionen an die Oberfläche gezogen, bis das elektrische Feld in der Lösung durch die Umverteilung negativer und positiver Ionen aufgehoben ist. Die an der Flüssigkeitsoberfläche akkumulierten positiven Ionen werden weiter in Richtung Kathode gezogen. Dadurch entsteht ein charakteristischer Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus), weil die Oberflächenspannung der Flüssigkeit dem elektrischen Feld entgegenwirkt. Bei ausreichend hohem elektrischen Feld bleibt der Konus stabil und emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom von wenigen μm Durchmesser. Dieser wird in einiger Entfernung von der Anode instabil und zerfällt in winzige, aneinandergereihte Tröpfchen. Die Oberfläche der Tröpfchen ist mit positiven Ladungen angereichert. Die ESI findet bei Atmosphärendruck statt, die anschließende Analyse der freien Ionen jedoch im Hochvakuum ($\leq 10^{-5}$ Torr). Dies erfordert ein spezielles Interface, um den Übergang der Ionen in den Massenanalysator zu gewährleisten. Der Ionisierungsraum steht über eine Mikroöffnung (100 μm) mit dem Massenspektrometer in Verbindung. Trockener, geheizter Stickstoff strömt zwischen der Mündung und der viel größeren Öffnung der Interface-Platte in den Ionisierungsraum (*curtain gas*, Abbildung 9). Der Stickstoff kollidiert mit den Molekülkomplexen des Elektrosprays. Dadurch wird verhindert, dass ein Großteil der Neutralteilchen in das Hochvakuum gesaugt wird. Außerdem unterstützen die Kollisionen auch die Desolvatisierung der Moleküle. In Abhängigkeit von Lösungsmittel und Analyt ist es möglich, dass bei der ESI relativ stabile Quasimolekülonen folgender Zusammensetzung gebildet werden: $[\text{M}+\text{H}]^+$

1. Einführung

z.B. bei Aminen, $[M-H]^-$ z.B. bei sauren Substanzen wie Carbonsäuren oder Phenolen und Addukte des Moleküls mit Na^+ , NH_4^+ , K^+ , $HCOO^-$, CH_3COO^-). [281]

1.8.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)

Falls der Analyt mit ESI schlecht ionisierbar ist, kann auf die APCI ausgewichen werden. Bei der APCI werden die Ionen nicht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes sondern durch einen Stickstoffstrom zerstäubt. [281]

1.8.3 Triple-Quadrupol

Triple-Quadrupol-Instrumente bestehen aus 4 Quadrupolen Q0 bis Q3. Ein Quadrupol ist im Prinzip ein Massenfilter, das heißt es werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z-Verhältnis durchgelassen. Dies wird durch eine Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol) erreicht. Unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes können Ionen eines definierten m/z-Verhältnisses auf einer stabilen oszillierenden Bahn den Quadrupol durchlaufen. Alle anderen Ionen fliegen auf instabilen Bahnen und werden durch Kollisionen mit den Metallstäben gestoppt. Beim Scannen des Massenbereichs werden Gleichspannung und Amplitude des Wechselfeldes gleichzeitig erhöht, wodurch Ionen verschiedener Massen nacheinander in den stabilen Bereich des Quadrupolfeldes gebracht werden. So kann ein Massenbereich von m/z 50 bis m/z 4000 gescannt werden.

Im Falle eines Triple-Quadrupol-Instruments (Abbildung 10, auch als Tandem-Massenspektrometer bezeichnet) ist Q0 ein mit Wechselstrom betriebener Hilfsquadrupol, mit dem die generierten Ionen zunächst fokussiert und anschließend in den zentralen Ionenweg überführt werden. Q1 ist der erste Messquadrupol zum Scannen der Ionen. Q2 führt die Ionen durch eine Kollisionskammer, die mit Stickstoffgas gefüllt ist. Durch Kollision mit den inerten Gasatomen fragmentieren die Ionen im Q2 (collision-induced dissociation, CID). Die Molekulargewichte der entstandenen Fragmentionen werden im Messquadrupol Q3 bestimmt. Für eine effektivere Fragmentierung werden die Ionen daher vor der Stoßaktivierung zusätzlich mit etwa 20-150 V beschleunigt.

1. Einführung

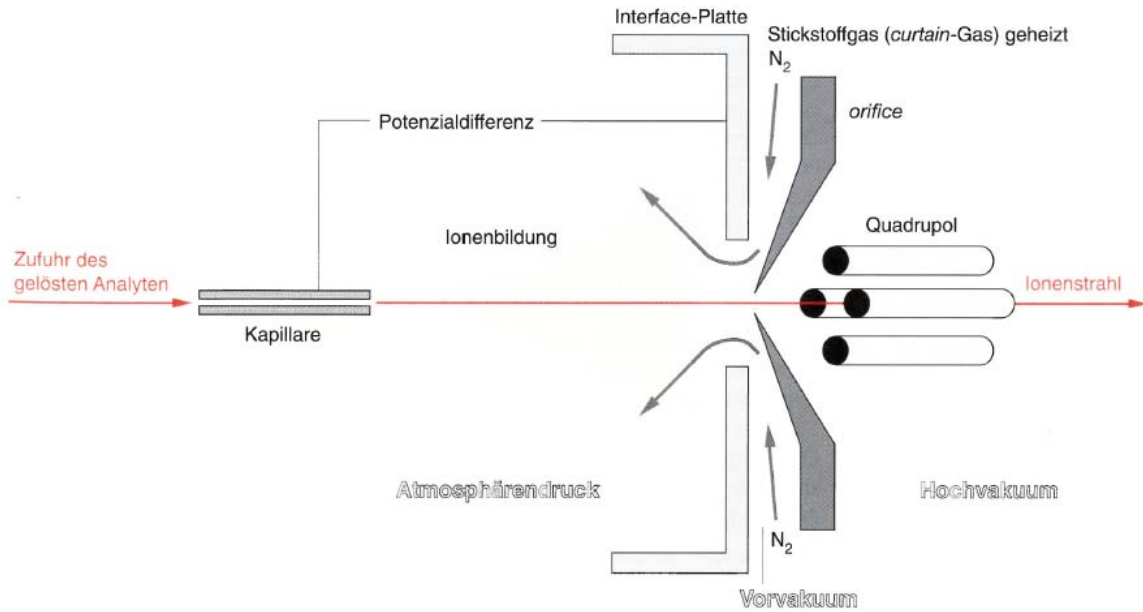


Abbildung 9: Aufbau einer ESI-Quelle mit Interface zu einem Quadrupolmassenspektrometer [281]

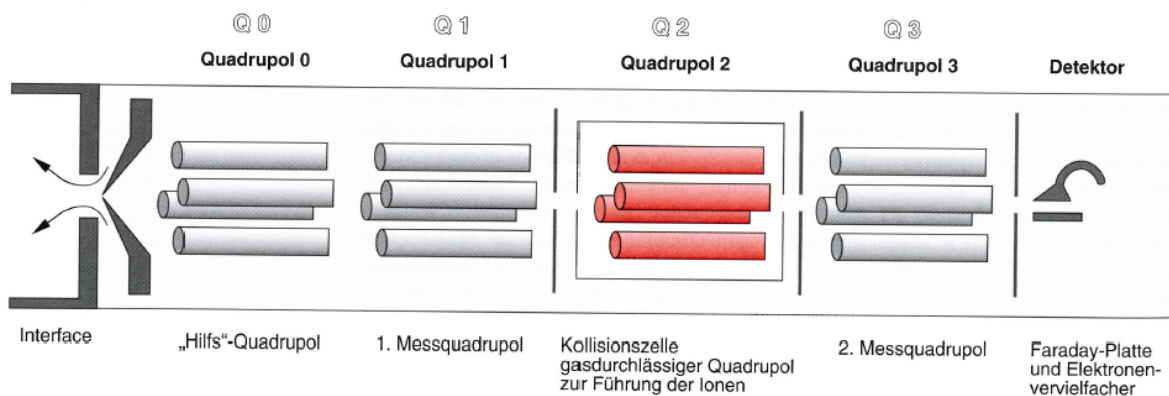


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers [281]

Mit diesen 4 Quadrupolen lassen sich nun verschiedene Experimente ausführen, von denen in dieser Arbeit folgende angewendet wurden:

1. Produktionen-Analyse (Enhanced Product Ion Scan, EPI): Das Quadrupolfeld von Q1 wird so eingestellt, dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses transferiert werden. Diese Vorläuferionen (precursor ions) werden im Q2 fragmentiert und die generierten Fragmentionen über den gesamten Massenbereich im Q3 analysiert (Abbildung 11).
2. Multiple Reaction Monitoring (MRM): Das Quadrupolfeld von Q1 wird so eingestellt, dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses transferiert

1. Einführung

werden. Durch Beobachtung von nur zwei oder drei Fragmentationen im Q3 pro Analyt kann sehr empfindlich und selektiv quantifiziert werden. Diese sogenannten Ionenübergänge Mutterion → Fragmentationen können durch Optimierung von Kollisionsenergie (CE) und cell exit potential (CXP) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit optimiert werden (Abbildung 11) [282]

1.8.4 Lineare Ionenfalle

Die Möglichkeit der Tandem-Massenspektrometrie wird heute in vielen Massenspektrometern mit Hilfe einer der Quadrupole anschließenden Ionenfalle verwirklicht [283]. Das Prinzip der Ionenfalle beruht auf dem Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld. Die Ionen können für variable Zeiten (μs bis s) auf stabilen Bahnen gehalten und dann nach ihrer Masse analysiert werden. Limitiert wird diese Funktion jedoch bei dreidimensionalen Ionenfallen (3D-IT) durch das relativ kleine Volumen der Falle, was ab einer bestimmten Füllmenge zu unerwünschten Raum-zu-Ladungs-Interferenzen führt und die Effektivität der Stabilisierung auf ca. 1-10 % der erzeugten Ionen in der Falle begrenzt [284]. Lineare Ionenfallen stellen eine Verbesserung dar, indem das Quadrupol-Spannungsfeld nur zweidimensional ausgebreitet wird, so dass die axiale Energie der Ionen in der Falle reduziert wird und sie sich zweidimensional wie eine Perlenschnur in der Mitte des Quadrupols aufreihen. Zusätzlich können durch das größere Volumen einer LIT gleichzeitig mehr Ionen stabilisiert werden.

In Tandem-Massenspektrometern kann nun Q3 auch als Ionenfalle genutzt werden. Während der Massenanalyse (Scan) in der LIT können die Ionen aus der Ionenquelle im Q0 zusätzlich akkumuliert werden (Q0 Trapping), sodass Ionenverluste minimiert und die Empfindlichkeit gesteigert wird. Die weiteren Vorteile dieser Kombination sind ein größerer dynamischer Bereich durch die selektive Füllung der Falle und die Aufnahme von kompletten Massenspektren ohne Diskriminierung von kleinen Massen („low mass cut off“), weil Selektion, Fragmentierung und Massenanalyse räumlich voneinander getrennt sind [281].

1. Einführung

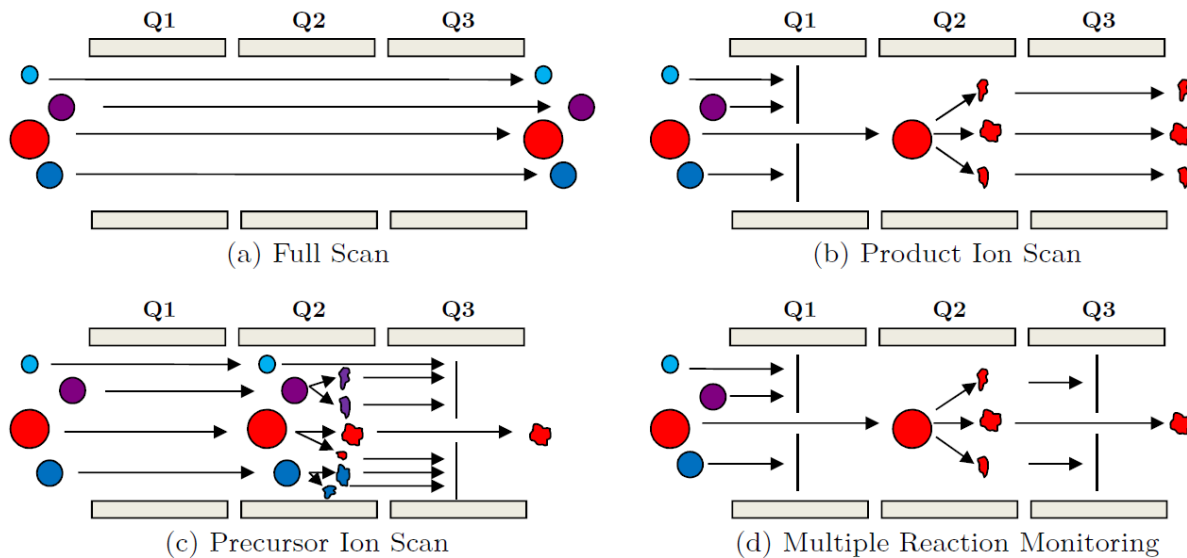


Abbildung 11: Prinzip des Multiple Reaction Monitoring (MRM, oben) und der Produktionen-Analyse (Enhanced Product Ion, EPI) auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer [285, 286]

1.8.5 Validierung massenspektrometrischer Methoden

Die Validierung analytischer Methoden ist eine Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen. Sie dient der Dokumentation der Eignung von Analysenverfahren für ihren Bestimmungszweck. Analysenbefunde, die mit validierten Methoden erhoben werden, sind daher nicht nur die Basis für eine verlässliche Interpretation, sondern auch im Streitfall bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen nur schwer anfechtbar. [287]

1.8.5.1 Selektivität und Spezifität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.

Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, einen Analyten oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (s.o.) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. [287]

1. Einführung

1.8.5.2 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist ihre Fähigkeit, innerhalb eines gegebenen Bereiches Testergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind. Dabei ist der Kalibrationsbereich einer analytischen Methode das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration des Analyten in der Probe, für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden konnte. Dieser sollte so gewählt werden, dass er einen möglichst großen Anteil der in authentischen Proben zu erwartenden Konzentrationen abdeckt. Sofern bekannt, sollte der therapeutische Konzentrationsbereich möglichst innerhalb des Kalibrationsbereichs liegen. [288]

1.8.5.3 Genauigkeit

Unter Bias versteht man die Differenz zwischen Messergebnis und Sollwert. Er ist ein Maß für die systematische Fehlerkomponente eines quantitativen Analysenverfahrens. Unter Richtigkeit (Trueness) versteht man den Abstand des Mittelwertes einer ausreichend großen Anzahl von Messwerten vom Sollwert. Das Ausmaß an Richtigkeit wird gewöhnlich in Form eines systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt. Unter Präzision versteht man den Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Sie ist ein Maß für die zufällige Fehlerkomponente eines quantitativen Analysenverfahrens. Die Präzision wird gewöhnlich in Form der „Impräzision“ ausgedrückt und als eine Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Unter Wiederholpräzision (Repeatability) versteht man die Präzision unter Bedingungen, bei denen unabhängige Messergebnisse mittels derselben Methode mit identischem Probenmaterial im selben Labor von derselben Person mit derselben Gerätschaft innerhalb kurzer Zeitintervalle erhalten werden. Unter Laborpräzision versteht man die Präzision bei der Bestimmung derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung eines Parameters (z.B. Person, Gerätschaft oder Zeit). [289]

1.8.5.4 Matrixeffekte und Wiederfindung

Die absolute Wiederfindung ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessende Lösung. Unter Matrixeffekten versteht man die direkte oder indirekte Veränderung des Messsignals durch die Anwesenheit unbeabsichtigter Analyten (zur Analyse) oder anderer interferierender Substanzen in

1. Einführung

der Probe. Dabei sind sowohl eine Unterdrückung (Ion suppression) als auch eine Verstärkung (Ion enhancement) des Messsignals möglich. [290]

1.8.5.5 Stabilität

Stabilität einer analytischen Methode beschreibt die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle. Die Stabilität eines Analyten sollte vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abschluss der Analyse gewährleistet sein. Die Stabilität während der Lagerung und während eventuell wiederholtem Einfrieren und Auftauen ist methodenunabhängig, so dass entsprechende Stabilitätsdaten aus der Literatur übernommen werden können. [288]

1.8.5.6 Analytische Grenzen

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist definiert als die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probe, bei der die Identifizierungskriterien erfüllt sind. Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probenmatrix, die mit akzeptablen Bias- ($\pm 20\%$) und Präzisionsdaten ($RSD \leq 20\%$) bzw. mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33 %, Signifikanz: 99 %) bestimmt werden kann. [291]

1.9 Headspace-Gaschromatographie

Eine Möglichkeit, um flüchtige Bestandteile von der nicht oder nur schwer flüchtigen Matrix abzutrennen, ist die sog. Headspace (Kopf- bzw. Dampfraum)-Technik. Dabei befindet sich die Probensubstanz in einer Probenflasche, die durch ein Septum (Gummidichtung) verschlossen ist. In dem Dampfraum über der Probe stellt sich bei meist erhöhten Temperaturen ein Gleichgewicht der flüchtigen Bestandteile zwischen Gasraum und Probe ein. Mit Hilfe einer gasdichten Spritze wird dann ein aliquoter Teil des Dampfraums über der Probe entnommen und direkt in den Injektor eines Gaschromatographen eingespritzt. Diese Methodik wird in der forensischen Toxikologie für die Bestimmung flüchtiger Blutkomponenten wie Ethanol, weiteren kurzkettigen Alkoholen und Aceton genutzt. Die Erfassung der Analyten nach der chromatographischen Trennung kann dann mittels Flammenionisationsdetektion (FID) erfolgen.

1. Einführung

1.10 Immunchemie

Bei Immunoassays ist das Grundprinzip die Erkennung und damit der Nachweis von Analyten durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper, deren hohe Spezifität und Bindungsstärke genutzt wird. Weit verbreitet ist die Markierung mittels Enzymen, die eine chemische Reaktion katalysieren, bei der entweder durch ein Substrat eine bestimmte Farbe entsteht oder über Chemilumineszenz Licht abgegeben wird. Ein weiteres optisches Verfahren ist die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen.

Auf Enzymmarkierungen basierende Assays werden als Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) bezeichnet. Dabei wird ein Antikörper zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Reporterenzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, eventuell auch durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist eine mit einem Photometer sehr genau bestimmbare Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Bei Radioimmunoassays (RIA) werden schwachradioaktive Substanzen zur Markierung verwendet, der Nachweis und die Quantifizierung erfolgen hierbei durch die Messung der Radioaktivität. Die Antikörper binden kompetitiv an die zu messenden Antigene und an die radioaktiven künstlichen Antigene: Radioaktiv markierte Antigene und „natürliche“ Antigene (also der in der Probe interessierende Gehalt) sind im Bindungsverhalten an die Antikörper gleich; die Bindungsplätze sind mit der Anzahl der Antikörper begrenzt. Je mehr natürliche Antigene vorhanden sind, desto weniger radioaktive Antikörper werden gebunden. Am Ende der Inkubationszeit werden ungebundene Antigene weggespült und die (gebundene) Radioaktivität bestimmt. So kann auf die gesuchte Antigenkonzentration in der Probe zurückgerechnet werden. [289]

2. Fragestellung

2 Fragestellung

Folgen einer Diabetes-Erkrankung sind die siebthäufigste Todesursache der Welt. Auch bei Lebenden sind Stoffwechselentgleisungen außergewöhnlich häufig zu verzeichnen und stellen z.B. bei der aktiven Teilnahme am Straßenverkehr eine Gefahr dar. Akute Komplikationen und Entgleisungen des Kohlenhydratstoffwechsels äußern sich in einem diabetischen Koma (diabetische Ketoazidose oder hyperosmolares Koma) bzw. einer Hypoglykämie. Die Diagnose dieser Komplikationen gerade bei forensischen Fragestellungen ist oft problematisch, bei Todesfällen auch aufgrund fehlender charakteristischer Obduktionsbefunde. In vielen Fällen ist man nicht in der Lage, einen unzweifelhaften Beweis für eine hypo- bzw. hyperglykämische Stoffwechselentgleisung zu erbringen. Die Diagnose post mortem kann daher nur durch eine Zusammenstellung der pathomorphologischen Befunde, der Anamnese und anhand von biochemischen Parametern gestellt werden. Das grundlegende Ziel dieser Arbeit ist es, diabetische Stoffwechselentgleisungen ante und post mortem analytisch so nachzuweisen, dass Befunde den hohen Anforderungen bei forensischen Fragestellungen standhalten.

Hypoglykämie ist nicht selten eine Folge von exogener Zufuhr von Insulin oder oralen Antidiabetika und besonders Insulin wird nicht nur überdosiert, sondern hat sich als effektives Mord- bzw. Suizidgift erwiesen. Bisher wurde Insulin in forensischen Fällen meistens über unspezifische Immunoassays nachgewiesen. Die Kreuzreaktivität von Immunoassays zu Vorläuferproteinen wird immer wieder kritisiert. Außerdem können diese Immunoassays neue synthetische Insuline nicht oder nur teilweise detektieren. Ziel dieser Arbeit ist es, flüssigkeitschromatographische-massenspektrometrische Methoden zum Nachweis sowohl von menschlichem Insulin als auch von kurz- und langwirksamen Insulinanaloga und oralen Antidiabetika zu entwickeln, zu validieren und in die Routineanalytik zu integrieren.

Das Verhältnis Insulin / C-Peptid stellt einen wichtigen Parameter dar, um eine exogene Zufuhr von humanem Insulin von anderen Formen der Hyperinsulinämie (z.B. Insulinom, Zufuhr oraler Antidiabetika) abzugrenzen. Ein erhöhter Insulinwert im Serum bei gleichzeitigen supprimierten C-Peptidkonzentrationen stellt einen Hinweis auf eine exogene Zufuhr von humanem Insulin dar. Eine weitere Aufklärung des Verhältnisses humanes Insulin zu C-Peptid mit Hilfe chromatographisch-massenspektrometrischer Methoden und Ermittlung von Cut-Offs zur Abgrenzung einer Injektion mit humanem Insulin zu physiologischen Verhältnissen oder zu

2. Fragestellung

anderen Ursachen hoher Inulinkonzentrationen (nach Einnahme oraler Antidiabetika) soll angestrebt werden. Weiterhin soll die Nachweismöglichkeit und Stabilität von Insulin vor und nach dem Tod in diversen Matrices untersucht werden.

Zur Bestimmung einer todesursächlichen Hyperglykämie steht dem forensischen Toxikologen die Summenformel nach Traub in der Glaskörperflüssigkeit und im Liquor cerebrospinalis zur Verfügung. Die Blutglucose wird nach dem Tod im Rahmen der Glykolyse rasch zu Laktat abgebaut, sodass sich aus der absoluten Glucosekonzentration kein Hinweis auf die Konzentration zum Zeitpunkt des Todes ergibt. Daher müssen metabolisch resistenteren Matrices wie die Glaskörperflüssigkeit zu Rate gezogen werden, wobei man sich einer Addition der Glucose- und Laktatkonzentrationen nach dem Tod behilft. Die Grenzwerte der „Traubschen Summenformel“ werden immer wieder diskutiert und auch die Bestimmung von HbA1c und Fructosamin nach dem Tod kann zwar eine Einordnung des diabetischen Status über die letzten Wochen ermöglichen, aber keine Rückschlüsse auf den glykämischen Status kurz vor dem Tod zulassen. Zusätzlich zu den oben dargestellten Punkten wurden die Ketonkörper Aceton, β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat nach dem Tod bestimmt. Ziel dieser Arbeit ist es zudem, nach weiteren potentiellen biochemischen Parametern zur Bestimmung einer ante mortem Hyperglykämie nach dem Tod zu suchen.

3. Material und Methoden

3 Material und Methoden

3.1 Allgemein

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Qualität	Firma	Sitz
Ammoniumformiat	Analytische Qualität	Sigma	Steinheim, Deutschland
Ameisensäure	Analytische Qualität	Sigma	Steinheim, Deutschland
Tert. Butyl-Methyl-Ether (TBME)	Analytische Qualität	Sigma	Steinheim, Deutschland
Acetonitril	HPLC grade	Sigma	Steinheim, Deutschland
Methanol	HPLC grade	Sigma	Steinheim, Deutschland
Water HPLC grade	HPLC grade	Riedel de Haen	Seelze, Deutschland
Essigsäure	100%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	25% in Wasser	Merck	Darmstadt, Deutschland
Magnetische beads mit Immunglobulin G auf der Oberfläche	10 ml	Invitrogen Dynal AS	Oslo, Norwegen
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)		Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Per analysi	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)		Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid		Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat		Merck	Darmstadt, Deutschland
Perchlorsäure	70%	Riedel de Haen	Seelze, Deutschland

Tabelle 12: Chemikalien und Reagenzien allgemein

3.1.2 Puffer und Lösungen

Der Salzpuffer pH 7,4 wurde einmal im Monat folgendermaßen frisch vorbereitet: 0,14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,98 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 8,1 g Natriumchlorid wurden zu 1 l Wasser HPLC grade gegeben und die Salze für 10 min im Ultraschallbad aufgelöst.

3.1.3 HPLC-MS

Alle Proben wurden auf einem Shimadzu (Duisburg, Germany) LC 20 series (binäre Pumpe, Entgaser, Controller und Autosampler) Flüssigkeitschromatograph, der an ein Applied Biosystems API4000 QTrap Massenspektrometer (Darmstadt, Deutschland) gekoppelt ist, gemessen. Q3 konnte wahlweise als Quadrupol oder als Lineare

3. Material und Methoden

Ionenfalle benutzt werden. Die Daten wurden mit der Software Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen.

3.1.4 Head-Space GC/FID

Die Ketonkörperbestimmung erfolgte mit Hilfe des TurboMatrix HS-110 Trap automatic headspace sampler (Perkin Elmer, Shelton, USA). Stickstoff wurde als Trägergas benutzt, die Ionen wurden mittels Flammenionisation detektiert.

3.2 Validierung

3.2.1 Leermatrix

Plasma von verschiedenen Spendern wurde vom Institut für Hämatologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Bei der Validierung ergab sich für einige Substanzen ein Problem: Humanes Insulin, C-Peptid, MG und AG liegen auch physiologisch immer im Plasma vor. Daher ist es für diese Analyten nicht oder nur sehr schwer möglich, Leerplasma zu erhalten. Im Falle von humanem Insulin und C-Peptid kann man sich insofern behelfen, dass man Plasma einige Tage bei Raumtemperatur stehen lässt. Insulin und das C-Peptid werden bei diesen Temperaturen abgebaut und so erhält man Plasma frei von diesen Analyten. Diese wurden vor dem Beginn der Validierung mittels der beschriebenen Methoden gemessen und erst bei vollständiger Abwesenheit der Analyten für die Validierung freigegeben. Für AG und MG ist es nicht möglich, Leerserum zu generieren, weshalb bei den Validierungen einige Besonderheiten beachtet werden mussten, auf die in den Kapiteln zu den jeweiligen Analyten eingegangen wird.

3.2.2 Selektivität und Spezifität

In der Praxis wurden sechs verschiedene Blank-Plasmaproben nach den beschriebenen Aufarbeitungsmethoden auf Peaks analysiert, die die Detektion der Analyten oder der IS störten. Zusätzlich wurden drei verschiedene Blank-Plasmaproben mit dem IS gespikt, um die Störung der Detektion der Analyten durch die IS zu untersuchen. Da für AG und MG keine Leerseren existieren, konnten bei diesen Analyten die Seren nur nach Peaks untersucht werden, die die Detektion des IS störten. Zudem wurde Wasser mit dem IS gespikt, um das Chromatogramm auf

3. Material und Methoden

Störpeaks zu untersuchen, die vom IS herrühren und die mit der Detektion des Analyten interferieren.

3.2.3 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden mindestens fünf von Null verschiedene, gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilte Kalibratoren durch Aufstocken von Leerseren hergestellt. Der niedrigste Kalibrator musste größer oder gleich der Bestimmungsgrenze sein. Um Wiederholbedingungen zu garantieren, sollten sechs Bestimmungen bei jeder Konzentration stattfinden. Die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) wurden dann gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren aufgetragen. Die Messwerte wurden folgenden statistischen Tests unterzogen:

- Test auf Ausreißer mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95%) und ggf. deren Elimination. Insgesamt dürfen nicht mehr als zwei Ausreißer und diese nicht auf dem gleichen Konzentrationsniveau auftreten.
- Test auf Varianzhomogenität mittels F-Test zwischen höchster und niedrigster Konzentration oder mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz: 99%)

Bei gegebener Varianzhomogenität (Homoskedastizität) erfolgte eine einfache lineare Regression und die Anpassung mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99%). Im Falle einer Heteroskedastizität wurde ein gewichtetes Kalibrationsmodell gewählt. Im Falle von AG und MG konnten die zugespikten Konzentrationen nur ein Zusatz zur physiologisch im Serum enthaltenen Konzentration sein. Kalibrationskurven wurden mittels der Standardadditionsmethode ausgewertet.

3.2.4 Lösemittelkalibration

Um wässrige/methanolische Kalibrierungen mit Matrixkalibrierungen zu vergleichen, wurden wässrige/methanolische Standards in denselben Konzentrationen hergestellt, die zu den Matrixproben zudosiert wurden. Anschließend wurde anhand der Steigungen der Geraden für jeden Analyten diskutiert, ob eine Lösungsmittelkalibration möglich ist.

3.2.5 Genauigkeit

Die Konzentrationen der sechs Kalibrationskurven wurden gewichtet und die gewichtete Kalibriergerade wurde zur Abschätzung der Genauigkeit mit dem Programm Valistat[®] (Arvecon GmbH, Walldorf, Deutschland) herangezogen. Die

3. Material und Methoden

errechneten Werte jeder Konzentration wurden gemittelt und der prozentuale Bias wurde zur Bestimmung der Genauigkeit herangezogen. Für die Bestimmung der Laborpräzision wurde für alle Methoden die tagesverschiedene Laborpräzision (time-different intermediate precision) benutzt. Dabei variiert der Zeitfaktor „Tag“ zwischen den Bestimmungen. Praktisch wurden homogene Pools von Qualitätskontrollproben (QC-Proben) bei mindestens zwei (niedrig und hoch relativ zum Kalibrationsbereich), möglichst aber drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch relativ zum Kalibrationsbereich) durch Aufstockung von Leermatrixpools generiert. Diese wurden zu einzelnen QC-Proben aliquotiert. Zwei QC-Proben (Wiederholpräzision) jeder Konzentration an mindestens acht verschiedenen Tagen (tagesverschiedene Laborpräzision) wurden analysiert. Die Wiederholpräzision und die tagesverschiedene Laborpräzision werden als relative Standardabweichungen angegeben und mit folgenden Formeln berechnet:

$$\mathbf{RSD}_r[\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

Formel 1: Bestimmung der Wiederholpräzision RSD_R mit s^2 : Wiederholvarianz und \bar{X} : Mittelwert aller Bestimmungen

$$\mathbf{RSD}_{(T)}[\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

Formel 2: Bestimmung der tagesverschiedenen Laborpräzision RSD_T mit s_t^2 : Wiederholvarianz, s_r^2 : Varianz zwischen den Tagen und \bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

3.2.6 Matrixeffekte und Wiederfindung

Nach Matuszewski et al. [174] werden fünf verschiedenen Leerplasmen auf folgende Art und Weise aufgearbeitet:

1. normale Aufarbeitung nach Spiken mit niedriger und hoher Konzentration bezogen auf den Kalibrierbereich
2. Aufarbeitung und Spiken der Extrakte nach Extraktion mit niedriger und hoher Konzentration
3. fünf methanolische Standards in der selben Konzentration wie die finalen Extrakte aus 1

3. Material und Methoden

Matrixeffekte sind definiert als der Anteil der absoluten Peakflächen der fünf gespikten Extrakte zu den Peakflächen der methanolischen Standards in derselben Konzentration. Wiederfindungsraten sind definiert als der Anteil der absoluten Peakflächen der fünf gespikten Plasmen zu den Peakflächen der gespikten Extrakte. Für den Mittelwert des Matrixeffektes gilt ein Akzeptanzintervall von 75-125%.

3.2.7 Analytische Grenzen

Zur Bestimmung von LoD und LoQ wurden mindestens fünf von Null verschiedene Kalibratoren beginnend im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze durch Aufstocken von Leermatrix hergestellt. Diese Kalibratorkonzentrationen sollten möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt sein und die Konzentration des höchsten Kalibrators darf maximal das Zehnfache der errechneten Nachweisgrenze sein. Damit ist der Bereich dieser Kalibrationskurve zur Bestimmung der analytischen Grenzen nicht identisch mit dem vollen Kalibrations- bzw. Linearitätsbereich der Methode.

Diese Kalibratoren wurden einmal analysiert. Die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) des Targetions wurden gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren aufgetragen und eine lineare Regression und Ermittlung der LoD und LoQ nach folgenden Formeln durchgeführt ($k = 3$ und mit $\alpha = 0,01$; Formel 3):

$$X_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}}$$

$$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

Formel 3: Bestimmung der Nachweisgrenze (LoD; oben) und der Bestimmungsgrenze (LoQ; unten) mit k : relative Ergebnisunsicherheit; s_{x_0} : Verfahrensstandardabweichung; $t_{f,\alpha}$: Quantil der t - Verteilung; m : Anzahl der Messungen; n : Anzahl der Kalibrationsniveaus; X : Gehaltsgröße; Q_x : Summe der Abweichungsquadrate; α Signifikanzniveau (Fehler 1. Art); β : Wahrscheinlichkeit (Fehler 2. Art).

Zusätzlich galt, dass die Bestimmungsgrenze die Nachweisgrenze nicht unterschreiten durfte. War die berechnete Bestimmungsgrenze kleiner als die

3. Material und Methoden

Nachweisgrenze, so wurde die Nachweisgrenze automatisch auch die Bestimmungsgrenze.

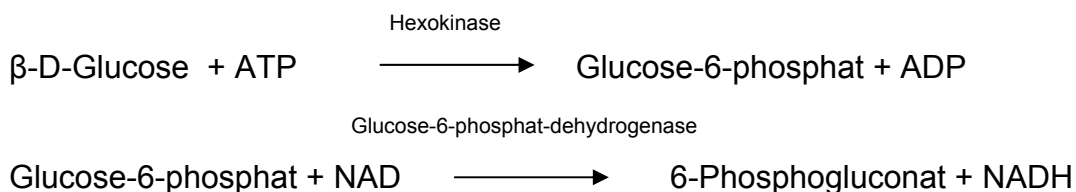
3.2.8 Ionenverhältnisse

Das Ionenverhältnis der Ionenübergänge im MRM Modus zwischen 1. Ionenübergang (Target, Quantifier) und 2. und 3. Ionenübergang (Qualifier) wurde überprüft. Bei einem relativen Ionenverhältnis > 50 % war ein 20 % Toleranzintervall akzeptabel, bei < 50% wurde ein 30% Toleranzintervall akzeptiert.

3.3 Analytik

3.3.1 Glucose und Laktat

Glucose wurde in klinischen Fällen mittels des immunchemischen Architect Glucose-Hexokinase-Testkits der Firma Abbott (Wiesbaden, Deutschland) im Diabetiszentrum Bad Oeynhausen bestimmt. Dabei wird die Glucose in der Probe bei Anwesenheit von ATP mittels des Enzyms Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Anschließend wird dies mittels der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase spezifisch zu 6-Phosphogluconat oxidiert (Formel 4). Ein mol NADH wird aus jedem mol Glucose gebildet. Das produzierte NADH absorbiert Licht einer Wellenlänge von 340 nm, die Absorption wird spektrophotometrisch gemessen.



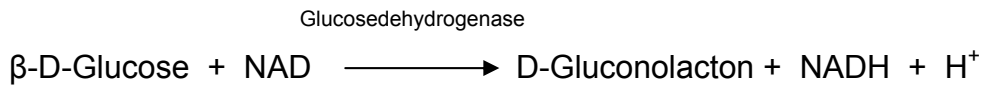
Formel 4: enzymatische Reaktionen des Glucose-Hexokinase-Tests

Folgende Validierungsparameter wurden von Abbott bestimmt: LoQ 3 mg/dl, Linearitätsbereich 10,5 mg/dl bis 697,7 mg/dl, intra day precision 0,99 % (bei 29,9 mg/dl, n = 50) und 0,69 % (bei 305,9 mg/dl, n = 50); inter day precision 0,00 % (bei 29,9 mg/dl, n = 50) und 0,00 % (bei 305,9 mg/dl, n = 50).

In forensischen Fällen wurde das Glucose Testkit der Firma Labor und Technik (Berlin, Deutschland) auf dem Olympus AU 400 Immunoanalyzer in der Rechtsmedizin Bonn benutzt. Dabei handelt es sich um einen enzymatischen Test,

3. Material und Methoden

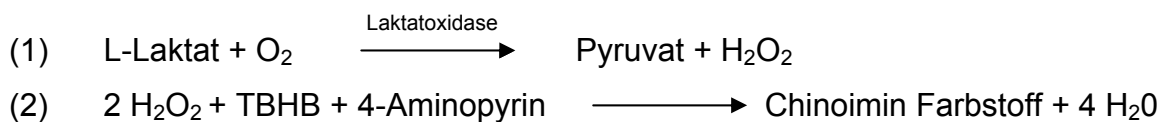
bei dem die Glucose mittels Glucosedehydrogenase nach der Reaktion gemäß Formel 5 oxidiert. Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucosekonzentration proportional und kann photometrisch erfasst werden.



Formel 5: enzymatische Reaktion des Glucosedehydrogenase-Tests von Labor und Technik

Folgende Validierungsparameter wurden von Labor und Technik bestimmt: LoQ 3 mg/dl, Linearitätsbereich bis 700 mg/dl, intra day precision 1,56 % (bei 96,7 mg/dl, n = 20), 1,4 % (bei 165 mg/dl, n = 20) und 0,83 % (bei 236 mg/dl, n = 20); inter day precision 1,63 % (bei 96,7 mg/dl, n = 20), 1,90 % (bei 165 mg/dl, n = 20) und 1,28 % (bei 236 mg/dl, n = 20). Es findet eine Einpunktkalibration statt.

Laktat wurde nur in forensischen Fällen als Teil der Summenformel nach Traub mittels des Laktatoxidase Testkits LOX-PAP der Firma Labor und Technik (Berlin, Deutschland) auf dem Olympus AU 400 Immunoanalyzer in der Rechtsmedizin Bonn gemessen. Der Test beruht auf der Umsetzung (Enzym: Laktatoxidase, Formel 6) von Laktat zu Pyruvat. Das in dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid wird dann in einer zweiten Reaktion zur Farbentwicklung eingesetzt.



Formel 6: enzymatische Reaktion des Laktattests mit TBHB: Tribrom-3-hydroxybenzoesäure

Folgende Validierungsparameter wurden von Labor und Technik bestimmt: LoQ: 1 mg/dl; Linearitätsbereich 1 bis 200 mg/dl; Kreuzreaktivität nur bei Ascorbinsäure ab > 20 mg/dl; intra day precision 1,44 % (bei 15,3 mg/dl, n=20), 1,44 % (bei 22,8 mg/dl, n = 20) und 0,67 % (bei 27,8 mg/dl, n = 20); inter day precision 0,54% (bei 15,0 mg/dl, n = 20), 2,01 % (bei 21,9 mg/dl, n = 20) und 1,31 % (bei 24,4 mg/dl, n = 20). Es findet eine Einpunktkalibration statt.

3. Material und Methoden

3.3.2 Glykierte Proteine

HbA1c wurde in klinischen Fällen mit dem Adams A1c HA-8180 Testkit von Arkray Europe (Amstelveen, Niederlande) im Diabeteszentrum Bad Oeynhausen gemessen. Dieses misst HbA1c im Vollblut mittels Umkehrphasen-Kationenaustausch-Chromatographie. Die mit einer Hämolyserlösung verdünnte Blutprobe wird in eine Säule geleitet und mittels HPLC in mehrere Hämoglobinfraktionen aufgetrennt. Folgende Validierungsparameter wurden von Arkray Europe bestimmt: Linearitätsbereich: 3-20 % (9-195 mmol/mol). Genauigkeitsdaten wurden nicht geliefert.

In forensischen Fällen wurde das HbA1c Testkit der Firma Labor und Technik (Berlin, Deutschland) auf dem Olympus 400 AU Immunoanalyzer in der Rechtsmedizin Bonn benutzt. Dabei handelt es sich um einen partikelverstärkten immunturbidimetrischen Test. Die Messung erfolgt ohne Messung des Gesamthämoglobins. Das Gesamthämoglobin und HbA1c binden beide mit derselben Affinität an Latexpartikel im Reagenz. Das Ausmaß der Bindung ist proportional zur relativen Konzentration beider Substanzen im Blut. Ein muriner monoklonaler anti-human HbA1c-Antikörper bindet dann an partikelgebundenes HbA1c. Ein polyklonaler anti-Maus IgG-Antikörper (Ziege) reagiert mit dem anti-human HbA1c-Antikörper und es kommt zu einer Agglutination. Die gemessene Extinktion ist proportional zum gebundenen HbA1c, das wiederum proportional zum prozentuellen Anteil von HbA1c in der Probe ist. Die Ergebnisse werden in der Einheit mmol HbA1c / mol Gesamthämoglobin angegeben. Die Kalibration wurde mit 4 Kalibrationspunkten und Natriumchlorid-Lösung (9 g/l) als Nullpunkt durchgeführt. Mit jeder Probenserie wurden 2 Qualitätskontrolllevel gemessen. Folgende Validierungsparameter wurden von Labor und Technik bestimmt: Linearitätsbereich 15-150 mmol/mol; keine Interferenzen; LoQ 10 mmol/mol; intra day precision 1,37 % (bei 35 mmol/mol, n = 20), 1,36 % (bei 80,7 mmol/mol, n = 20) und 1,8 % (bei 114 mmol/mol, n = 20); inter day precision 1,82 % (bei 36,5 mmol/mol, n = 20), 1,67 % (bei 83,3 mmol/mol, n = 20) und 1,58 % (bei 116 mmol/mol, n = 20).

Beide Tests sind standardisiert nach der IFCC Referenzmethode [235].

Fructosamin wurde in klinischen Fällen mit dem Architect Fructosamin Testkit von Abbott (Wiesbaden, Deutschland) im Diabeteszentrum Bad Oeynhausen gemessen. Das im Serum vorliegende Fructosamin liegt im alkalischen Milieu in der

3. Material und Methoden

Enaminolform vor. Dieses reduziert Nitroblautetrazolium zu Formazan. Die Kinetik der Farbentwicklung (bei Wellenlänge 546 nm) ist der Fructosamin-Konzentration proportional. Folgende Validierungsparameter wurden von Abbott bestimmt: Linearitätsbereich 11-1000 $\mu\text{mol/l}$; bei proteinpathologischen Zuständen Werte verfälscht; Glucose bis 900 mg/dl interferiert nicht; LoQ 11 $\mu\text{mol/l}$; intra day precision 0,93 % (bei 190,5 $\mu\text{mol/l}$, n = 40), 0,78 % (bei 314 $\mu\text{mol/l}$, n = 40) und 0,49 % (bei 547,9 $\mu\text{mol/l}$, n = 40); inter day precision 4,51 % (bei 190,5 $\mu\text{mol/l}$, n = 40), 2,96 % (bei 314 $\mu\text{mol/l}$, n = 40) und 2,20 % (bei 547,9 $\mu\text{mol/l}$, n = 40).

In forensischen Fällen wurde das Fructosamin Testkit der Firma Labor und Technik (Berlin, Deutschland) auf dem Olympus AU 400 Immunoanalyzer in der Rechtsmedizin Bonn benutzt. Die Analytik ist dabei dieselbe wie beim Abbott Testkit. Die Kalibration wurde als Einpunktkalibration durchgeführt. Mit jeder Probenserie wurden 2 Qualitätskontrolllevel gemessen. Folgende Validierungsparameter wurden von Labor und Technik bestimmt: Linearitätsbereich 10-1000 $\mu\text{mol/l}$; bei proteinpathologischen Zuständen Werte verfälscht; Glucose bis 800 mg/dl interferiert nicht; LoQ 10 $\mu\text{mol/l}$; intra day precision 0,90 % (bei 286 $\mu\text{mol/l}$, n = 21), 0,70 % (bei 270 $\mu\text{mol/l}$, n = 21) und 0,8 % (bei 521 $\mu\text{mol/l}$, n = 21); inter day precision 3,0 % (bei 296 $\mu\text{mol/l}$, n = 21), 1,4 % (bei 273 $\mu\text{mol/l}$, n = 21) und 1,7 % (bei 512 $\mu\text{mol/l}$, n = 21).

3.3.3 Humanes und synthetische Insuline

3.3.3.1 Immunchemie

Für die Messung des Insulins per Immunoassay wurde das ARCHITECT Insulin Reagent Kit der Firma Abbott (Wiesbaden, Deutschland) im Diabeteszentrum Bad Oeynhausen verwendet. Dabei handelt es sich um einen CMIA (Chemilumineszenz-Mikroimmunoassay). 20 μl Serum werden benötigt. Folgende Validierungsdaten wurden von der Firma Abbott getestet: Linearitätsbereich 1,0-300 $\mu\text{U/ml}$; intra day precision 3,8 %, inter day precision 4,8 % (bei 7,6 $\mu\text{U/ml}$, n = 3); intra day precision 2,0 %, inter day precision 2,5 % (bei 38 $\mu\text{U/ml}$, n = 3); intra day precision 1,9 %, inter day precision 2,2 % (bei 119 $\mu\text{U/ml}$, n = 3); Wiederfindung in 5 verschiedenen Seren bei 3 Wiederholungen 93,8 %; LoD 1,0 $\mu\text{U/ml}$; Kreuzreaktivität: Proinsulin bei 10^6 pg/ml \leq 0,1 %, C-Peptid bei 10^7 pg/ml \leq 0,001 %, Glukagon bei 10^7 pg/ml \leq 0,001 %.

3. Material und Methoden

3.3.3.2 Chemikalien und Reagenzien LC-MS

Die Insuline wurden von Lilly (humanes Insulin als Huminsulin[®] und Insulin lispro als Humalog[®], beide 100 U/ml; Bad Homburg, Deutschland), NovoNordisk (Insulin aspart als Novomix[®] und Insulin detemir als Levemir[®], beide 100 U/ml; Mainz, Deutschland) und Sanofi Aventis (Insulin glargin als Lantus[®] und Insulin glulisin als Apidra[®], 100 U/ml; Frankfurt, Deutschland) bezogen. Der Interne Standard (IS) Rinderinsulin wurde von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. 94 % der Aminosäuresequenz des Rinderinsulins entspricht der des humanen Insulins. Anti-Insulin Antikörper-Lösung (1,0 mg/ml) wurde von der CER groupe (Marloie, Belgien) gekauft. Diese Antikörperlösung wurde 1:10 mit Salzpuffer pH 7,4 verdünnt, in Aliquote von 1 ml geteilt und bis zur Anwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3.3 Stamm- und Arbeitslösungen der Insuline

Rinderinsulin wurde in allen Proben als IS benutzt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 1,25 U/ml in 2% Essigsäure. Eine Arbeitslösung (12,5 mU/ml) wurde an jedem Arbeitstag frisch hergestellt. Die Stammlösungen der Analyten wurden in 2% Essigsäure angesetzt (1 U/mL) und vor der Probenvorbereitung in die Arbeitslösung (1 mU/ml) verdünnt. Stammlösungen wurden bei 4° C gelagert. Um die Adsorption der Insulinmoleküle an Glasoberflächen zu minimieren, wurden alle Lösungen in LoBind Protein Reaktionsgefäßen (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufbewahrt.

3.3.3.4 Optimierte Probenvorbereitung LC-MS

15 µl der IS Arbeitslösung (12,5 mU/ml = 1 pmol/µl) wird zu 2 ml Serum gegeben. Zunächst schließt sich eine Proteinfällung mit 2 ml Acetonitril an. Die Probe wird dann 10 s gevortext und 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein LoBind Protein Reaktionsgefäß überführt. 300 µl Salzpuffer pH 7,4, 75 µl Anti-Insulin- Antikörper (0,1 mg/ml) und 150 µl der magnetischen beads werden zugegeben. Die Mischung wird 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Überstand von den nun an den Antikörper-Insulin-Komplex gebundenen magnetischen beads mittels eines Magneten getrennt. Die beads werden dreimal mit 300 µl Salzpuffer pH 7,4 durch 5 s vortexen, 30s zentrifugieren bei 10.000 g und Trennung von der Lösung durch magnetische Kraft gewaschen. Zur Dissoziation der Analyten von den beads wurden diese für 15 min in 80 µl 2 % Essigsäure inkubiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml LoBind Protein

3. Material und Methoden

Reaktionsgefäß überführt. 30 µl der Probe wurden direkt aus diesem Gefäß ins chromatographische System injiziert.

3.3.3.5 Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Die chromatographische Trennung wurde mittels einer Zorbax StableBond Vorsäule (1 mm*17 mm, 5 µm Partikelgröße) und einer Zorbax 300SB C₁₈ analytischen Säule (1*50 mm, 3,5 µm Partikelgröße) bei einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt. Die mobilen Phasen bestanden aus 0,2 % Essigsäure mit 0,01 % TFA (Phase A) und 0,04 % Essigsäure und 0,002 % TFA in Acetonitril (Phase B). Der Gradient startet bei 0 % B, endet bei 100 % B nach 10 min bei einer Flussrate von 0,15 ml/min. Innerhalb der nächsten 8 min wird der Gradient wieder auf 0 % B zurückgesetzt und ein 7 min Equilibrierungsschritt bei 0% B angeschlossen. Die Moleküle wurden per ESI im positiven Ionenmodus bei einer Nadelspannung von 5500 V ionisiert. Massenspektrometrische Parameter wurden optimiert, indem eine Lösung (1 mU/ml) der Analyten oder des IS direkt in die Ionenquelle infundiert wurden und die in Tabelle 13 aufgeführten Parameter manuell optimiert wurden. EPI Spektren wurden in einem Massenbereich von *m/z* 100 bis 400 aufgenommen. Die Analyten können aufgrund ihrer charakteristischen Produktionen unterschieden werden.

Analyt	Molekular gewicht [Da]	Precursor Ion; <i>m/z</i>	Charakteristische Produktionen	Kollisionsenergie [eV]	Declustering potential [eV]
Humanes Insulin	5807	(M+5H) ⁵⁺ = 1162,5	120,129,136, 143, 80 219, 226	80	70
Insulin lispro	5807	(M+5H) ⁵⁺ = 1162,5	120,129,136,143, 80 217, 219	80	70
Insulin aspart	5826	(M+5H) ⁵⁺ = 1166,2	120, 129, 136, 80 143, 219, 226	80	70
Insulin glulisin	5823	(M+5H) ⁵⁺ = 1165,5	120, 129, 136, 80 143, 199, 213	80	70
Insulin detemir	5916	(M+5H) ⁵⁺ = 1184,6	120, 136, 143, 90 219, 357	90	70
Insulin glargin	6064	(M+6H) ⁶⁺ = 1011,4	120, 129, 136, 80 143, 175, 219	80	70
Rinderinsulin	5733	(M+6H) ⁶⁺ = 956,4	120, 129, 136, 80 143, 219, 226	80	70

Tabelle 13: Massenspektrometrische Daten und Parameter Insuline

3. Material und Methoden

Da Novolog (m/z 1166,2) und Apidra (m/z 1165,5) ähnliche Precursor-Ionen aufweisen, wurde die Detektion durch die Aufnahme eines Produktionen-Scans bei m/z 1165,5 für beide Analyten erreicht. Spannungen und Gaseinstellungen wurden wie folgt optimiert: Curtain Gas = 25 psi, Temperatur = 400 °C, Ion Source Gas 1 = 40 psi (für Levemir 50 psi), Ion Source Gas 2 = 40 psi. Die Ionen wurden im Quadrupol 0 gefangen, die Eintrittsbarriere in Quadrupol 3 wurde auf 8 V festgelegt und eine Ionenfallenfüllzeit von 20 ms wurde bestimmt.

3.3.3.6 Besonderheiten bei der Validierung LC-MS

Das Validierungsprozedere musste in zwei Teile aufgeteilt werden, da die Detektion mittels EPI Insulin lispro und humanes Insulin und ebenso Apidra und Novolog aufgrund ihrer identischen Molekülgewichte nicht nebeneinander quantifizieren kann. Eine komplette Validierung wurde mit den Analyten humanes Insulin, Novolog und Lantus, eine andere Validierung mit Humalog, Apidra und Levemir durchgeführt. Die Methode wurde in humanem Plasma validiert.

Linearität: Matrixkalibrationsstandards wurden in den Konzentrationen 5 $\mu\text{U/ml}$, 10 $\mu\text{U/ml}$, 20 $\mu\text{U/ml}$, 50 $\mu\text{U/ml}$, 75 $\mu\text{U/ml}$, 100 $\mu\text{U/ml}$ und 200 $\mu\text{U/ml}$ hergestellt.

Analytische Grenzen: 2 Kalibrationskurven im niedrigen Bereich der Kalibrationskurve mit folgenden Konzentrationen in Plasma wurden angefertigt: 1 $\mu\text{U/ml}$, 2,5 $\mu\text{U/ml}$, 5 $\mu\text{U/ml}$, 7,5 $\mu\text{U/ml}$, 10 $\mu\text{U/ml}$ und 20 $\mu\text{U/ml}$.

Wiederfindung und Matrixeffekte: Wiederfindung und Matrixeffekte wurden in den Konzentrationen 10 $\mu\text{U/ml}$ und 100 $\mu\text{U/ml}$ bestimmt. *Stabilitätsstudien für humanes Insulin:* Blut von 3 Nicht-Diabetikern wurde in Serummonovetten gesammelt, zentrifugiert, in Aliquote geteilt und bei -20°C gelagert. Einige Aliquote wurden mit den Insulinase-Inhibitoren Diamid (1 mmol/l) oder Phenylmethansulfonylchlorid (PMSC; 1 mmol/l) versetzt. Humanes Insulin wurde mit der oben beschriebenen Methodik sofort, 24 h, 96 h, eine Woche und zwei Wochen nach dem Sammeln vermessen. Die Stabilität wurde als ausreichend angesehen, wenn die Abnahme der Peakfläche von humanem Insulin innerhalb von 2 Wochen weniger als 20 % betrug.

3. Material und Methoden

3.3.4 C-Peptid

3.3.4.1 Immunchemie

Für die Messung des C-Peptids per Immunoassay wurde das ARCHITECT C-Peptide Reagent Kit der Firma Abbott (Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um einen CMIA (Chemilumineszenz-Mikroimmunoassay). 75 µl Serum werden benötigt. Folgende Validierungsdaten wurden von der Firma getestet: Linearitätsbereich 0-30 ng/ml; Referenzwerte Median 1,78 ng/ml; intra day precision 2,4 %, inter day precision 3,2 % (bei 0,96 ng/ml, n = 160); intra day precision 1,9 %, inter day precision 2,3 % (bei 3,9 ng/ml, n = 160); intra day precision 1,9 %, inter day precision 2,1 % (bei 17,9 ng/ml, n = 160); Wiederfindung 96,2 % (n = 10); LoD 0,01 ng/ml; LoQ 0,08 ng/ml; Kreuzreaktivität: Proinsulin bei 100 ng/ml: 12,8 %, Humaninsulin bei 8660 ng/ml : 0 %, Glukagon bei 10000 ng/ml: 0 %.

3.3.4.2 Chemikalien LC-MS

C-Peptid und der IS Val-d₅- C-Peptid wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) erhalten. Anti-C-Peptid Antikörper-Lösung (1,0 mg/ml) wurde von der Firma Abdserotec (Düsseldorf, Deutschland) gekauft. Diese Antikörperlösung wurde 1:10 mit Salzpuffer pH 7,4 verdünnt, in Aliquote von 1 ml geteilt und bis zur Anwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4.3 Stammlösungen C-Peptid

Val-d₅- C-Peptid wurde in allen Proben als IS benutzt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 300 µg/ml in 2 % Essigsäure. Eine Arbeitslösung (3 µg/ml) wurde an jedem Arbeitstag frisch hergestellt. Die C-Peptid-Stammlösung wurde in 2 % Essigsäure angesetzt (1 mg/mL) und vor der Probenvorbereitung in die Arbeitslösung (1 µg/ml) verdünnt. Stammlösungen wurden bei 4° C gelagert. Um die Adsorption der C-Peptid-Moleküle an Glasoberflächen zu minimieren, wurden alle Lösungen in LoBind Protein Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

3.3.4.4 Optimierte Probenvorbereitung LC-MS/MS

10 µl der IS Arbeitslösung (3 µg/ml) wird in einem LoBind Protein Reaktionsgefäß zu 2 ml Serum gegeben. 300 µl Salzpuffer pH 7,4, 30 µl Anti-Insulin-Antikörper (0,1 mg/ml) und 75 µl der magnetischen beads werden zugegeben. Die Mischung wird 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Serum von den nun an den Antikörper-C-Peptid-Komplex gebundenen magnetischen beads mittels eines

3. Material und Methoden

Magneten getrennt. Die beads werden dreimal mit 300 µl Salzpuffer pH 7,4 durch 5 s vortexen, 30 s zentrifugieren bei 10.000 g und Trennung von der Lösung durch magnetische Kraft, gewaschen. Zur Dissoziation der Analyten von den beads wurden diese für 15 min in 80 µl 2 % Essigsäure inkubiert. Der Überstand wird in ein 1,5 ml LoBind Protein Reaktionsgefäß überführt. 30 µl der Probe wurden direkt aus diesem Gefäß ins chromatographische System injiziert.

3.3.4.5 Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Die chromatographische Trennung wurde mittels einer Zorbax StableBond Vorsäule (1 mm*17 mm, 5 µm Partikelgröße) und einer Zorbax 300SB C₁₈ analytischen Säule (1*50 mm, 3,5 µm Partikelgröße) bei einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt. Die mobilen Phasen bestanden aus 0,2% Essigsäure mit 0,01 % TFA (Phase A) und 0,04 % Essigsäure und 0,002 % TFA in Acetonitril (Phase B). Der Gradient startet bei 20 % B, endet bei 90 % B nach 15 min bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Innerhalb der nächsten 3 min wurde der Gradient wieder auf 20% B zurückgesetzt und ein 4 minütiger Equilibrierungsschritt bei 20 % B angeschlossen. Die Moleküle wurden per ESI im positiven Modus bei einer Nadelspannung von 5500 V ionisiert. Massenspektrometrische Parameter wurden optimiert, indem eine Lösung (1 mU/ml) des Analyten oder des IS direkt in die Ionenquelle infundiert wurde und die in Tabelle 14 aufgeführten Parameter für eine Detektion im MRM manuell optimiert wurden.

Analyt	Declustering potential [V]	Target Ionenübergang			Qualifier Ionenübergang		
		m/z	CE [V]	CXP [V]	m/z	CE [V]	CXP [V]
C - Peptid	56	1007,5	-	-	1007,5	-	-
		86,0	129	46	146,9	51	6
Val-d ₅ - C -Peptid	56	1013,0	-	-	1013,0	-	-
		85,9	113	18	130,2	101	12

Tabelle 14: Optimierte massenspektrometrische Parameter Methode C-Peptid

3.3.5 Proinsulin

Für die Messung des Proinsulins wurde der Human Intakt Proinsulin ELISA der Firma Reco medical AG (Sissach, Schweiz) verwendet. Es handelt sich um einen „two-site“ sandwich enzyme-linked immunosorbent Test. Die Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für die C-Peptid/Insulin A-

3. Material und Methoden

Kettenbindung beschichtet. Dieser Antikörper kann intakte Proinsulin-Isotope binden: des-(31,32)-Proinsulin und split-(32,33)-Proinsulin. Insulin, C-Peptid und andere „des“-oder „split“-Formen sollen nicht gebunden werden (Bedienungsanleitung Teco ELISA). Anschließend wird die Extinktion bei 450 nm gemessen, die der Proinsulin-Konzentration direkt proportional ist. Folgende Validierungsdaten wurden von der Firma getestet: Intraday precision 2,0 % (n = 12), interday precision 2,65 % (n = 20), LoD 0,3 pmol/l, Wiederfindung (0 pmol/l zugefügt) 100,0 % (n = 5), Wiederfindung (10 pmol/l zugefügt) 103,5 % (n = 5), Referenzwerte Nicht-Diabetiker $3,99 \pm 1,58$ pmol/l (SD), Median 3,61 pmol/l, Kreuzreaktionen: Humanes Insulin < 10000 pmol/l, Humanes C-Peptid 50000 pmol/l, Proinsulin des (31,32) < 200 pmol/l, Proinsulin split (32,33) 5000 pmol/l, des(64,65) Proinsulin 200 pmol/l, split (65,66) Proinsulin 1000 pmol/l.

3.3.6 Orale Antidiabetika

3.3.6.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma	Sitz
Glibenclamid, Glimperid, Glisoxepid, Gliclazid, Repaglinid	Sigma	Steinheim, Deutschland
Gliquidon	Astellas	München, Deutschland
Glipizid	Pfizer	Karlsruhe, Deutschland
Nateglinid	Novartis	Nürnberg, Deutschland
Pioglitazon	Takeda	London, UK
Rosiglitazon	GlaxoSmithKline	Brentford, UK
Sitagliptin	Merck Sharpe and Dohme	Hertfordshire, UK
Vildagliptin	MSD	Haar, Deutschland
Saxagliptin	Bristol Myers Squibb	Middlesex, UK
Hydroxytolbutamid - d ₉ , Repaglinid - ethyl - d ₅ , Pioglitazon - d ₄ , Vildagliptin - d ₃	Toronto Research Chemicals	Toronto, Kanada

Tabelle 15: Chemikalien für die Analytik oraler Antidiabetika

3. Material und Methoden

3.3.6.2 *Probenvorbereitung*

Serumproben (0,5 ml) werden mit 50 µl des IS-Mix versetzt (1 µg/ml Hydroxytolbutamid-d₉, Repaglinid-ethyl-d₅, Pioglitazon-d₄ und Vildagliptin-d₃). Die wässrige Phase wird mit 4 ml TBME extrahiert. Nach einminütigem Vortexen und 10 min Zentrifugieren bei 4.000 rpm wird die organische Phase in ein anderes Reagenzglas überführt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird anschließend durch die Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer (pH 3) reduziert und erneut mit 4 ml TBME extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Stickstoff bei 60°C bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in 200 µl Acetonitril wiederaufgenommen. Ein Aliquot von 5 µl wurde in das LC-MS/MS System injiziert.

3.3.6.3 *Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen*

Die HPLC war mit einer Luna[®] Reversed phase C₈ analytischen Säule (Partikelgröße 3 µm, 150*2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und einer Kromasil[®] C₁₈ Vorsäule (Partikelgröße 4*2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) ausgestattet. Die Laufmittel bestanden aus A: Ammoniumformiat (0,005 M, mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt)/Acetonitril 90:10 und B: Acetonitril. Der Gradient und die Flussrate wurden folgendermaßen eingestellt: 0-4 min 40 % B (Fluss: 0,3 ml/min), 4-6 min 90 % B (Fluss: 0,5 ml/min), 6-7min 90 % B (Fluss: 0,7 ml/min), 7-10 min 40 % B (Fluss: 0,3 ml/min). Die Ionisation fand per ESI im positiven Modus bei 400°C statt. Alle Analyten wurden mit 2 Ionenübergängen von protonierten Molekülonen zu Fragmentionen im MRM erfasst. Für jeden Analyten wurde der intensivste Ionenübergang für die Quantifizierung, der zweitintensivste Ionenübergang für die Qualifizierung des Analyten genutzt. Die optimierten Ionenübergänge, Kollisionsenergien und Ionenverhältnisse zur Quantifizierung jedes Analyten sind in Tabelle 16 dargestellt.

3.3.6.4 *Besonderheiten bei der Validierung*

Die LC-MS/MS Methode wurde in humanem Plasma für die Quantifizierung der in Abbildung 4 dargestellten Analyten validiert. Für Kalibrierungen und Quantifizierung wurden die Peakflächenverhältnisse Analyt / IS benutzt. Sulfonylharnstoffe wurden auf Hydroxytolbutamid-d₉, die Glinide auf Repaglinid-ethyl-d₅, die Glitazone auf Pioglitazon-d₄ und die Gliptine auf Vildagliptin-d₉ bezogen.

3. Material und Methoden

Analyt	Decustering Potential	Target Ionenübergang	CE	Qualifier Ionenübergang	CE	Relative Ionenintensität (Area qualifier/ Area target)*100)
Glimepirid	106	491,17 352,1	- 19	491,24 126,09	- 37	33,40%
Gliclazid	66	324,17 127,12	- 23	324,17 110,08	- 53	56,80%
Glipizid	56	446,30 103,08	- 61	446,30 77,06	- 101	52,10%
Glibenclamid	81	494,16 368,95	- 19	494,16 168,95	- 49	31,40%
Glibornurid	86	367,16 170,1	- 25	367,16 152,0	- 29	91,50%
Gliquidon	91	528,28 403,0	- 19	528,28 386,0	- 31	33,60%
Glisoxepid	11	450,25 115,16	- 33	450,25 141,07	- 33	46,30%
Repaglinid	26	453,33 230,14	- 47	453,33 162,04	- 25	36,00%
Nateglinid	66	318,37 166,0	- 21	318,37 125,1	- 21	79,20%
Rosiglitazon	91	358,23 135,2	- 37	358,23 119,2	- 75	17,20%
Pioglitazon	76	357,25 134,1	- 43	357,25 119,08	- 63	12,60%
Vildagliptin	61	304,19 153,9	- 25	304,19 97,0	- 43	43,20%
Sitagliptin	71	408,22 235,0	- 27	408,22 173,9	- 39	85,30%
Saxagliptin	66	316,22 180,0	- 29	316,22 163,0	- 51	4,70%
Hydroxy Tolbutamid d ₉	- 71	296,40 83,0	- 21	296,40 90,1	- 59	8,90%
Repaglinid-ethyl - d ₅	81	458,14 230,1	- 39	458,14 162,3	- 29	38,60%
Pioglitazon d ₄	- 91	361,15 138,2	- 41	361,15 123,1	- 69	57,10%
Vildagliptin d ₃	- 62	307,20 162,9	- 20	307,20 106,0	- 40	40,70%

Tabelle 16: Optimierte Ionenübergänge, Kollisionsenergien und relative Ionenintensitäten orale Antidiabetika

Linearität: Kalibrationsstandards (9 Kalibrationslevel) wurden durch Spiken von Leerplasma mit methanolischen Standards erstellt (Tabelle 17). Die Konzentrationen der Analyte wurden mit einem linearen Regressionsmodell aufgetragen. **Präzision des Messgeräts („Instrument precision“):** Qualitätskontrollproben in niedrigen und

3. Material und Methoden

hohen Konzentration wurde extrahiert und fünf mal innerhalb einer Batch und in fünf unterschiedlichen Batches injiziert, um die Präzision des Messgeräts zu testen. *Genauigkeit:* Tabelle 17 zeigt die Konzentration der Qualitätskontrollproben. *Stabilität aufgearbeiteter Proben:* Die Stabilität der Analyten in extrahierten Proben wurde ermittelt, indem zwei Konzentrationen der Analyten sechs Mal analysiert wurden, nachdem die sechs Extrakte der sechs Proben zunächst vereint wurden, um sie anschließend wieder in sechs Teile aufzuteilen. Diese sechs Proben wurden dann innerhalb eines Tages in Intervallen von zwei Stunden gemessen. Die maximale Abweichung von der ersten Messung und die Genauigkeit wurde bestimmt. Die absoluten Peakflächen jeder Konzentration wurde auf die Injektionszeit bezogen. Stabilität in der extrahierten Probe wurde angenommen, wenn innerhalb von 10 Stunden die absoluten Peakflächen nur um 20 % von der ersten Probe abwichen. *Matrixeffekte und Wiederfindung:* Die niedrige und hohe Konzentration waren: 5 und 150 ng/ml für Glibenclamid, 50 und 750 ng/ml für Gliquidon, 50 und 750 ng/ml für Glibornurid, 50 und 2500 ng/ml für Gliclazid, 25 und 1000 ng/ml für Glimepirid, 10 und 750 ng/ml für Glipizid, 50 und 750 ng/ml für Glisoxepid, 2 und 250 ng/ml für Repaglinid, Nateglinid, Pioglitazon, Rosiglitazon und 5 und 200 ng/ml für Vildagliptin, Sitagliptin und Saxagliptin. *Analytische Grenzen:* Die LoD wurde definiert als die geringste Konzentration, die mit statistischer Sicherheit bei einem Signal-Rausch-Verhältnis > 3 noch detektiert werden kann. Für die Bestimmung wurden Qualitätskontrollproben mit 1 ng/ml jedes Analyten vermessen. Das mittlere Hintergrundrauschen plus dreifacher Standardabweichung wurde aus sechs Leerplasma-proben (Selektivität) bei den entsprechenden Retentionszeiten im MRM errechnet.

3. Material und Methoden

Analyt	Konzentrationslevel Linearität [ng/ml]	QC-Level Low, Middle, High [ng/ml]	Coefficient of determination (R ²)
Glimepirid	10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 3000	25 (Low) 250 (Middle) 1000 (high)	0,9994
Gliclazid	10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000	50 (Low) 500 (Middle) 2500 (High)	0,9984
Glipizid	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000	10 (Low) 100 (middle) 750 (High)	0,9966
Glibenclamid	1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200	5 (Low) 50 (middle) 150 (High)	0,9966
Glibornurid	10, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 750, 1000	50 (Low) 150 middle) 750 (High)	0,999
Gliquidon	10, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 750, 1000	50 (Low) 150 (middle) 750 (High)	0,9993
Glisoxepid	10, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 750, 1000	40 (Low) 200 (middle) 750 (High)	0,9952
Repaglinid	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	2 (Low) 25 (middle) 250 (High)	0,9973
Nateglinid	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	2 (Low) 25 middle) 250 (High)	0,9972
Rosiglitazon	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	2 (Low) 25 Middle) 250 (High)	0,9992
Pioglitazon	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	2 (Low) 25 (middle) 250 (High)	0,9952
Sitagliptin	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	5 (Low) 50 (middle) 200 (High)	0,998
Vildagliptin	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	5 (Low) 50 (middle) 200 (High)	0,9915
Saxagliptin	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500	5 (Low) 50 (middle) 200 (High)	0,9944

Tabelle 17: Konzentrationen der gespikten Plasmaproben für Linearitätsstudien orale Antidiabetika

3. Material und Methoden

3.3.7 Methylglyoxal

3.3.7.1 Chemikalien und Reagenzien

MG (40% Arbeitslösung in Wasser), 3,4-Hexandion und 2,3-Diaminonaphthalen wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) erhalten.

3.3.7.2 Stamm- und Arbeitslösungen, QC-Lösungen

Die kommerziell erhältliche Stammlösung von MG (40%) und des IS (1 mg/ml 3,4-Hexandion in Methanol) wurden auf 100 µg/ml mit Methanol verdünnt, unter Heliumatmosphäre und in Braunglasflaschen gelagert. Für jede Probenbatch wurde die IS Arbeitslösung (1 µg/ml Methanol) frisch hergestellt. Für jede neue Kalibrationskurve wurde die MG Stammlösung frisch verdünnt, um Serum oder post mortem Femoralblut mit den zusätzlichen Konzentrationen zu spiken: 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml. QC-Proben wurden ebenfalls frisch am Tag der Probenvorbereitung in folgenden zusätzlichen Konzentrationen hergestellt: 15 ng/ml (low), 60 ng/ml (middle) und 125 ng/ml (high).

3.3.7.3 Probenvorbereitung Serum und post mortem Blut

Post mortem Proben, die immer eine höhere Konzentration MG als der höchste Kalibrationspunkt aufwiesen, wurden vor der Probenvorbereitung mit HPLC grade Wasser 1:10 verdünnt. 500 µl Blutserum oder verdünntes post mortem FVB wurden mit 10 µl der IS Arbeitslösung (1 µg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 250 µl Perchlorsäure (7 %) gefällt und MG aus seiner hohen Proteinbindung befreit. Die Probe wurde dann für 10 s gemischt, für 15 Minuten stehen gelassen und für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von 250 µl gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 100 µl 2,3-Diaminonaphthalen (1 mg/ml in Methanol) über Nacht bei 4°C derivatisiert (Derivatisierungsschema in Abbildung 12). Die Probe wurde mit 4 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Überführen der organischen Phase in ein anderes Reagenzglas wurde diese unter Stickstoff bei 40°C eingedampft und in 200 µl Methanol wiederaufgenommen.

3.3.7.4 Überwachung des Derivatisierungsschritts

Die Beendigung des Derivatisierungsschritts wurde getestet, indem MG und der IS in drei Konzentrationen (10 ng/ml, 40 ng/ml, 200 ng/ml) nach Zugabe des

3. Material und Methoden

Derivatisierungsmittels nach 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h und 48 h extrahiert und vermessen wurden.

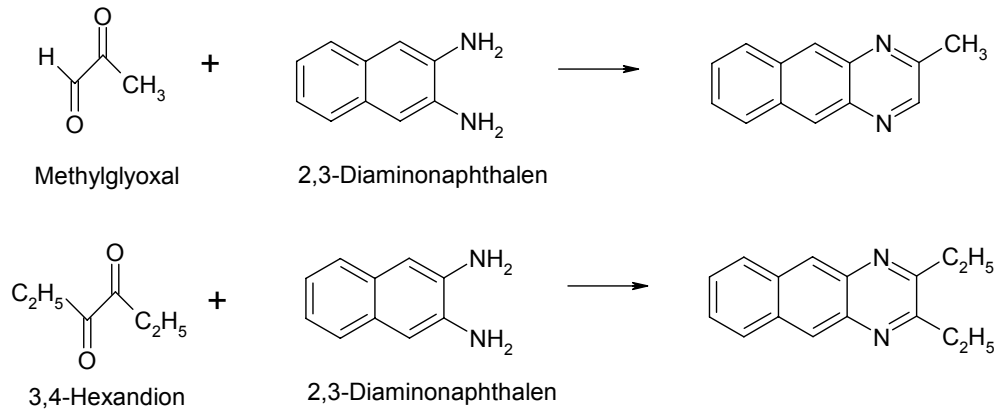


Abbildung 12: Derivatisierung von MG und des IS mit 2,3-Diaminonaphthalen

3.3.7.5 Probenvorbereitung Zellmaterial

Das Zellmaterial wurde mit 1 ml Lysepuffer versetzt und solange gevortext, bis das gesamte Zellmaterial homogen im Puffer verteilt war. Anschließend wurde die Lösung dreimal nacheinander zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Ultraschallbad wieder aufgetaut. Durch dieses Prozedere wurden die Zellwände lysiert und das MG freigesetzt. 100 µl der Lösung wurden dann mit 400 µl HPLC grade Wasser versetzt und mit der Proteinfällung wie unter 3.3.7.3 beschrieben fortgesetzt.

3.3.7.6 Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Die chromatographische Trennung wurde mittels einer Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) Synergi® MAX-RP C₁₂ analytischen Säule (150*2 mm, 4 µm Partikelgröße) und einer Phenomenex C₁₈ (4*2mm) Vorsäule bei einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt. Ein Gradient wurde mit den folgenden Eluenten angelegt: Eluent A war 5 mM Ammoniumformiat in Wasser HPLC grade, der pH-Wert mit Ameisensäure auf 3,5 eingestellt. Eluent B war 5 mM Ammoniumformiat in Methanol. Der Gradient war: 70 % Eluent B auf 90 % Eluent B in 7 Minuten, 90 % Eluent B auf 70 % B in 0,5 Minuten, abschließend 2,5 Minuten Equilibrierung bei 70 % Eluent B. Es wurde per ESI im positiven Modus gemessen. Die massenspektrometrischen Parameter wurden optimiert, indem eine Lösung des derivatisierten MG oder des derivatisierten IS direkt in die Ionenquelle infundiert wurde. Dazu wurde 1 ml einer Lösung von MG oder des IS (20 µg/ml) über Nacht mit 2,3-Diaminonaphthalen bei 4°C derivatisiert und mit der oben aufgeführten Methodik

3. Material und Methoden

aufgearbeitet. Die optimierten Ionenübergänge, Declustering potentials, CE und CXP im MRM werden in Tabelle 18 gezeigt. Spannungen und Gaseinstellungen wurden wie folgt optimiert: Curtain Gas = 30 psi, Ion Spray Voltage 5500 V; Temperatur = 420 °C, Ion Source Gas 1 = 40 psi, Ion Source Gas 2 = 60 psi; Entrance Potential 10 V.

Analyt	Declustering potential [V]	Target Ionenübergang	CE [V]	CXP [V]	Qualifier Ionenübergang	CE [V]	CXP [V]
MG Derivat	81	195.1	-	24	195.1	-	14
		126.7	49		77.0	63	
IS Derivat	86	237.1	-	36	237.1	-	6
		222.0	35		126.9	85	

Tabelle 18: Optimierte Ionenübergänge, declustering potentials, Kollisionsenergien und cell exit potentials der MG-Methodik

3.3.7.7 Besonderheiten bei der Validierung

Die Methode wurde in humanem Serum und post mortem Femoralblut validiert. *Genauigkeit:* Genauigkeitsdaten wurden nur in Blutserum als Matrix erhoben. Die Qualitätskontrollproben wurden gegen ein lineares Regressionsmodell ausgewertet, indem die Standardadditionsmethode benutzt wurde. Die Konzentrationen der 6 Matrixkalibrationen wurden gewichtet und die gewichtete Kalibrationskurve wurde nach Subtraktion der initialen Konzentration und Extrapolierung zur y-Achse zur Abschätzung der Genauigkeitsdaten herangezogen. *Analytische Grenzen:* Für die Bestimmung der analytischen Grenzen wurde Wasser mit den folgenden Konzentrationen im erwarteten Bereich der LoD gespikt: 1 ng/ml, 2 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 7.5 ng/ml, 10 ng/ml. Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurde die Peakfläche des schwächeren Qualifierpeaks von MG auf die Peakfläche des IS Targetpeaks bezogen und mittels linearer Kalibration ausgewertet. *Stabilität in klinischen Proben:* Blut von 10 Freiwilligen wurde sofort zentrifugiert. Das Blutserum wurde in Aliquote aufgeteilt, sofort aufgearbeitet und gemessen oder bei -20 °C gelagert und 24 h, 48 h, 5 d und 8 d nach Probennahme aufgearbeitet. Stabilität wurde angenommen, wenn die Abnahme der absoluten Peakflächenvon MG innerhalb der 14 Tage weniger als 20% betrug. *Veränderungen der MG Konzentrationen in forensischen Proben nach dem Tod:* FVB, GKF und CSF von 5 Verstorbenen ohne eine Diabeteserkrankung (Mittelwert der Zeit zwischen Tod und Obduktion 3,0 Tage; Fallinformationen in Tabelle 29, 4.3.5) wurden bei der

3. Material und Methoden

Obduktion gesammelt und die MG-Konzentration sofort, 24 h, 48 h, 5 d, 8 d oder 10 d nach Probennahme gemessen. Glucose- und Laktat-Konzentrationen in der GKF und der CSF wurden gemessen. Zu diesem Anlass wurden die post mortem-Proben mit Aceton gefällt und mit einer Natriumchlorid-Lösung (7% in Wasser) 1:2 verdünnt.

3.3.8 Anhydroglucitol

3.3.8.1 Chemikalien

1,5-Anhydro-D-glucitol wurde von Sigma (Steinheim, Deutschland), der IS 1,5- Anhydro-D-[¹³C₆] glucitol (98 atom% ¹³C) von Omicron Chemicals (South Bend, USA) erhalten.

3.3.8.2 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Stammlösungen von AG und dem IS wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in HPLC grade Wasser angesetzt. Die Arbeitslösung des IS hatte die Konzentration 200 µg/ml HPLC grade Wasser.

3.3.8.3 Optimierte Probenvorbereitung

Die Proben wurden nach Li et al. [287, 292] vorbereitet: 50 µl Serum wurde mit 10 µl der IS-Arbeitslösung (200 µg/ml 1,5-Anhydro-D-[¹³C₆] glucitol) versetzt und die Proteine durch Zugabe von 200 µl Methanol gefällt. Die Probe wurde 10 s gevortext und 10 min bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde fünffach mit Acetonitril verdünnt. 10 µl dieses verdünnten Extrakts wurden dann ins chromatographische System injiziert.

3.3.8.4 Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Die chromatographische Trennung wurde mit einer Luna[®] NH₂ (150*2 mm, 3 µm Partikelgröße) analytischen Säule von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) und einer Phenomenex NH₂ (4*2mm) Vorsäule durchgeführt. Ein isokratischer Fluss (0,5 ml/min) mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80:20, v/v) für 6 min wurde genutzt. Die Moleküle wurden mittels APCI im negativen Modus ionisiert. Die massenspektrometrischen Parameter wurden optimiert, indem eine Lösung (10 µg/ml) von AG oder des IS direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers infundiert wurde. Die optimierten Ionenübergänge im MRM waren 162,8-112,7 (target) und 162,8-101,0 (qualifier) für AG und 168,9-105,0 für den IS. Declustering Potentiale waren -20 V für AG und -25 V für den IS, CE -10 V (target) und -7 V (qualifier) für die Übergänge von AG und -12 V für den IS. CXP waren -7 V für AG und -5 V für the IS. Die Spannungen und

3. Material und Methoden

Gaseinstellungen wurden wie folgt optimiert: Curtain Gas 10 psi, Ion Spray Voltage -4500 V, Temperatur 450 °C, Ionenquelle (Gas 1) 50 psi, Ionenquelle (Gas 2) 40 psi, Entrance Potential -10 V.

3.3.8.5 Besonderheiten bei der Validierung

Die Methode wurden in humanem Serum validiert [293]. Für postmortem Vollblut wurde die Methode teilweise validiert (keine Genauigkeit). *Linearität:* Kalibrationsstandards für AG wurden in den zusätzlichen Konzentrationen 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml hergestellt. *Genauigkeit:* Zur Herstellung von QC-Proben wurden wässrige Lösungen hergestellt und derart zu Serum dotiert, dass die zusätzlichen Konzentrationen low (3 µg/ml), medium (15 µg/ml) und high (40 µg/ml) entstanden. *Analytische Grenzen:* Die Kalibrierung zur Bestimmung der analytischen Grenzen wurde in Wasser erstellt. Wasser wurde so gespikt, um dieselbe Konzentration wie die finalen Extrakte der sieben Kalibrationslevel 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,0 µg/ml und 1,5 µg/ml im Bereich der erwarteten LoD zu erreichen. *Matrixeffekte und Wiederfindung:* Die Methode von Matuszewski et al. [294] wurde aufgrund des endogenen Vorkommens von AG folgendermaßen verändert: zu jeder Probe, die normalerweise zur Bestimmung der Matrixeffekte und der Wiederfindung aufgearbeitet wurde, wurde zusätzlich eine „Leer“probe aufgearbeitet und die absoluten Peakflächen dieser „Leer“probe von der absoluten Peakfläche der gespikten Proben abgezogen. Die beiden Konzentrationen betragen 2,5 µg/ml und 25 µg/ml. *Stabilität in klinischen Proben:* Blut von 10 Freiwilligen wurde direkt nach der Entnahme zentrifugiert und in sechs Teile aliquotiert. Ein Teil wurde direkt aufgearbeitet und gemessen, die anderen Aliquote wurden bei -20°C gelagert und 24 h, 48 h, 72 h, 7 d und 14 d nach der Entnahme aufgearbeitet. Stabilität wurde angenommen, wenn die Abnahme der absoluten Peakfläche des Targetionenübergangs von AG innerhalb von 14 Tagen weniger als 20 % betrug. *Stabilität in forensischen Proben:* FVB von 5 Verstorbenen ohne eine Diabeteserkrankung (PMI 3,2 Tage) wurde bei der Obduktion gesammelt und jeweils sofort, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d und 14 d doppelt auf AG analysiert.

3.3.8.6 Das Verhältnis Vollblut-Serum

Das Verhältnis Vollblut/Serum von AG wurde bestimmt, indem Serum und Vollblut von 20 gesunden lebenden Nicht-Diabetikern bestimmt wurden.

3. Material und Methoden

3.3.9 Ketonkörper

3.3.9.1 Chemikalien

Die Enzyme β -Hydroxybutyratdehydrogenase und Laktat-Dehydrogenase wurden von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) erhalten. Aceton, Lithium-Acetoacetat, Natrium- β -Hydroxybutyrat, Pyruvat, Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und tertiär-Butanol wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) erhalten.

3.3.9.2 Probenvorbereitung

Zur gaschromatographischen Bestimmung von Aceton ist keine vorherige Probenaufarbeitung notwendig. 1 ml Blut wird in ein 20 ml Head-Space-Vial pipettiert und 100 μ l einer Lösung des IS (tertiär-Butanol, 100 μ g/ml) zugegeben. Anschließend wird die Probe vermessen.

Für die Bestimmung des Acetoacetat-Gehalts wird ähnlich vorgegangen: 1ml der Matrix mit internem Standard wird in ein Head-Space-Vial gegeben und das Acetoacetat wird im Head-Space Ofen 60 min bei einer Temperatur von 100°C zu Aceton decarboxyliert. Anschließend wird die Probe vermessen.

β -Hydroxybutyrat muss dagegen vorher in einer enzymatischen Reaktion in Acetoacetat umgewandelt werden. Dazu werden zu 1 ml Matrix IS, 10 μ mol Pyruvat, 0,5 μ mol NAD, 10 μ l β -Hydroxybutyratdehydrogenase und 10 μ l Laktat-Dehydrogenase zugefügt. Das Enzym β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wandelt β -Hydroxybutyrat in 30 min bei 45°C in Acetoacetat um. Daran schließt sich wiederum eine einstündige Decarboxylierung an.

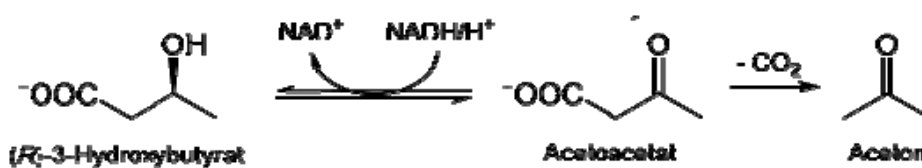


Abbildung 13: Reaktion von Hydroxybutyrat zu Aceton während der Probenvorbereitung

3.3.9.3 Head Space gaschromatographische Parameter

Die Head-Space-Bedingungen für die Bestimmung des Acetons sind wie folgt: Nadeltemperatur: 90°C, Ofentemperatur: 60°C, Transfertemperatur: 90°C, Thermostatierzeit: 20 Minuten. Die Head-Space Bedingungen für die Bestimmung von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat sind wie folgt: Nadeltemperatur: 110°C,

3. Material und Methoden

Ofentemperatur: 100°C, Transfertemperatur: 115°C, Thermostatierzeit: 60 Minuten. Die Injektortemperatur betrug 150 °C, die Detektortemperatur 250 °C. Folgendes Temperaturprogramm wurde gefahren: Start: 40 °C, 15 Minuten halten; mit 4°C/min auf 200°C, 10 Minuten halten; mit 15°C/min auf 230°C, 10 Minuten halten.

3.3.9.4 Validierung

Folgende Validierungsparameter wurden bestimmt: Linearitätsbereich: 0-3000 mg/l (Aceton); 0-1000 µmol/l (Acetoacetat); 0-30000 µmol/l (β-Hydroxybutyrat); LoQ 0,6 mg/l (Aceton); 9,5 µmol/l (Acetoacetat); 85 µmol/l (β-Hydroxybutyrat); intra day precision 5,0 % (bei 10 mg/l, n = 16), 2,6 % (bei 100 mg/l, n = 16) für Aceton; 13 % (bei 100 µmol/l, n = 16) und 1,7 % (bei 1000 µmol/l, n = 16) für Acetoacetat und 2,8 % (bei 100 µmol/l, n = 16) und 0,2 % (bei 1000 µmol/l, n = 16) für β-Hydroxybutyrat; inter day precision 10,0 % (bei 10 mg/l, n = 16) und 5,1 % (bei 100 mg/l, n = 16) für Aceton; 1,7 % (bei 100 µmol/l, n = 16) und 14,0 % (bei 1000 µmol/l, n = 16) für Acetoacetat und 4,5 % (bei 100 µmol/l, n = 16) und 0,2 % (bei 1000 µmol/l, n = 16) für β-Hydroxybutyrat.

3.4 Probenmaterial

3.4.1 Klinische Proben

Serum von 480 Diabetikern wurde aus dem Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen erhalten. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Ruhr-Universität Bochum und der Universität Bonn genehmigt. Die Diagnose des Diabetestyps wurde auf der Basis von spezifischen Messungen (Antikörperscreening, oraler Glucosetoleranztest) oder der Anamnese bei Aufnahme ins Krankenhaus getätigt. Das Blut wurde morgens nach dem Aufstehen und nach Medikamenteneinnahme entnommen und innerhalb der folgenden Stunden zentrifugiert. Das Serum wurde bis zum Transport bei -20 °C gelagert und der Transport auf Trockeneis innerhalb von 3 Werktagen durchgeführt. Glucose, Fructosamin, humanes Insulin, C-Peptid, Proinsulin und AG wurde im Serum gemessen. HbA1c wurde noch vor der Zentrifugation im EDTA-Blut gemessen. Für die MG-Untersuchungen wurden zusätzlich zu Blutproben von 100 Diabetikern (24 Typ 1 Diabetiker und 74 Typ 2 Diabetiker, 2 mit einem unbekanntem

3. Material und Methoden

Diabetestyp) Blut von 18 Nicht-Diabetikern gesammelt und in gleicher Weise behandelt.

Die klinische Population wurde für die statistische Auswertung neben der Einteilung nach Geschlecht, Diabetestyp oder Länge der Diabeteserkrankung nach ihrer Medikation aufgeteilt. Die humanen Insulin-Konzentrationen waren nur bei Diabetikern quantifizierbar, in deren Serum kein Humalog® (Insulin lispro) mittels LC-MS nachgewiesen werden konnte. Diese wurden aus dem Kollektiv entfernt und das Restkollektiv in die im Folgenden aufgeführten Gruppen eingeteilt:

1. Diabetiker ohne nachgewiesene antidiabetische Medikation
2. Diabetiker nach Einnahme oraler Antidiabetika, die mittels der beschriebenen LC-MS/MS-Methodik quantifiziert wurden (siehe Kapitel 3.3.6.3). Alle Patienten, bei denen synthetische Insulinanaloga mittels LC-MS nachgewiesen werden konnten oder in deren Anamnese die Einnahme von humanem Insulin verordnet war, wurden aus dem Kollektiv entfernt.
3. Diabetiker nach Injektion von synthetischen Insulinanaloga, die mittels der beschriebenen LC-MS-Methodik (siehe Kapitel 3.3.3.5) quantifiziert wurden. Alle Patienten, bei denen orale Antidiabetika mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden konnten oder in deren Anamnese die Einnahme von humanem Insulin verordnet war, wurden aus dem Kollektiv entfernt.
4. Diabetiker nur unter Therapie mit humanem Insulin. Die Therapie mit humanem Insulin wurde dem ärztlichen Bericht entnommen. Alle Patienten, bei denen orale Antidiabetika mittels LC-MS/MS oder synthetische Insulinanaloga mittels LC-MS nachgewiesen werden konnten, wurden aus dem Kollektiv entfernt.

3.4.2 Vergleich der immunchemischen mit der chromatographischen Methode für humanes Insulin

Humanes Insulin im Serum wurde bei 203 Diabetikern mit beiden beschriebenen (3.3.3.1 und 3.3.3.4) Methoden gemessen. Bei allen Patienten wurde die Einnahme von synthetischen Insulinen, die die immunchemische Insulinanalytik stört, mittels der LC-MS-Methodik ausgeschlossen.

3.4.3 Forensische Proben

Forensische Proben wurden dem Obduktionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn entnommen. Fallbeispiel 5.3.10.1 wurde vom Institut für

3. Material und Methoden

rechtsmedizin der Universität Düsseldorf bereitgestellt. Die Einteilung der Verstorbenen in Nicht-Diabetiker und Diabetiker wurde auf Basis der Patienten- und Gerichtsakten getätigt. Blut wurde aus der Vena femoralis entnommen, Urin während der Obduktion durch eine Punktion der Blase gewonnen. Die Glaskörperflüssigkeit (GKF) wurde aus dem rechten Auge nach Punktion der vorderen Augenkammer mit einer feinen Spritze vorsichtig angesaugt. Der Liquor cerebrospinalis (CSF) wurde durch eine suboccipitale Punktion gewonnen. Für die Analytik wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand genommen. GKF, CSF und Urin wurden nach Zentrifugation unbehandelt vermessen. Die Konzentrationen lagen vor allem bei Laktat oberhalb der Kalibrationsbereiche und die Proben wurden mit einer Natriumchlorid-Lösung (9 g/l) vor der Messung verdünnt. Glucose, Laktat und Fructosamin wurden im mit Aceton (1:1) gefällten FVB, GKF und CSF gemessen. HbA1c wurde im FVB gemessen. 20 µl des Bluts wurden dazu mit 1000 µl Hämolyse-reagenz versetzt und bis zur vollständigen Hämolyse 5 min stehen gelassen.

3.4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Aufgeführt werden bei Variablen mit Normalverteilung der Mittelwert, der Bereich zwischen minimaler und maximaler Konzentration und die Standardabweichung. Einzelne Kollektive wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests (bei 2 Kollektiven) und mittels des Kruskal-Wallis-Tests (bei mehr als 2 Kollektiven) miteinander verglichen. Um einzelne Parameter miteinander zu korrelieren, wurde eine Korrelationskoeffizienten-Analyse nach Pearson und multiple Regressionsanalysen durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4 Ergebnisse

4.1 Analytische Methodenentwicklung

4.1.1 Humanes und synthetische Insuline

Die chromatographische Trennung und Enhanced Produktionenspektren der unterschiedlichen Insuline werden in Abbildung 14 dargestellt. Die Methode wurde erfolgreich in humanem Serum validiert. Die wichtigsten Validierungsdaten sind in Tabelle 19 dargestellt. Selektivität ist gegeben. Es gab keine interferierenden Peaks mit den Signalen aller Insuline. Weiterhin störte der IS nicht bei der Detektion der Analyten. Die Methode ist für alle Insuline innerhalb des Kalibrationsbereichs 5-200 $\mu\text{U/ml}$ (0,2-8 ng/ml) linear. Regressionskoeffizienten waren immer $R^2 > 0,99$. Eine wässrige und eine Matrixkalibration waren aufgrund der unterschiedlichen Wiederfindungsraten von Analyten und IS nicht vergleichbar. Daher musste bei der Routineanalytik auf zwei Matrixkalibrationen (für jeweils 3 Analyten) zurückgegriffen werden. Die LoD aller Insuline liegt bei $< 2 \mu\text{U/ml}$ ($< 0,08 \text{ ng/ml}$), die LoQ bei $< 5 \mu\text{U/ml}$ ($< 0,2 \text{ ng/ml}$). Nüchtern-Konzentrationen von humanem Insulin, die normalerweise bei 5-30 $\mu\text{U/ml}$ (0,2-1,2 ng/ml) liegen, können mit dieser Methode detektiert werden. Matrixeffekte waren innerhalb der akzeptablen Bereiche 75 % bis 125 %. Wiederfindungsraten mit dieser Immunoaffinitätsaufreinigung betragen 33,2-51,7 %. Für die Stabilitätsstudien wurde Serum sofort nach der Probensammlung von den roten Blutkörperchen getrennt. Abbildung 15 zeigt die Veränderungen der humanen Insulinkonzentrationen von drei Patienten im Serum in den ersten zwei Wochen nach Probensammlung. Die Abnahme der Peakfläche des humanen Insulins betrug weniger als 20 % und die Insulinkonzentration war über den Zeitraum von 2 Wochen stabil, sodass bei diesen Bedingungen eine Stabilität angenommen werden kann. Der Zusatz von Insulinase-Inhibitoren brachte keinen Stabilitätsvorteil.

4. Ergebnisse

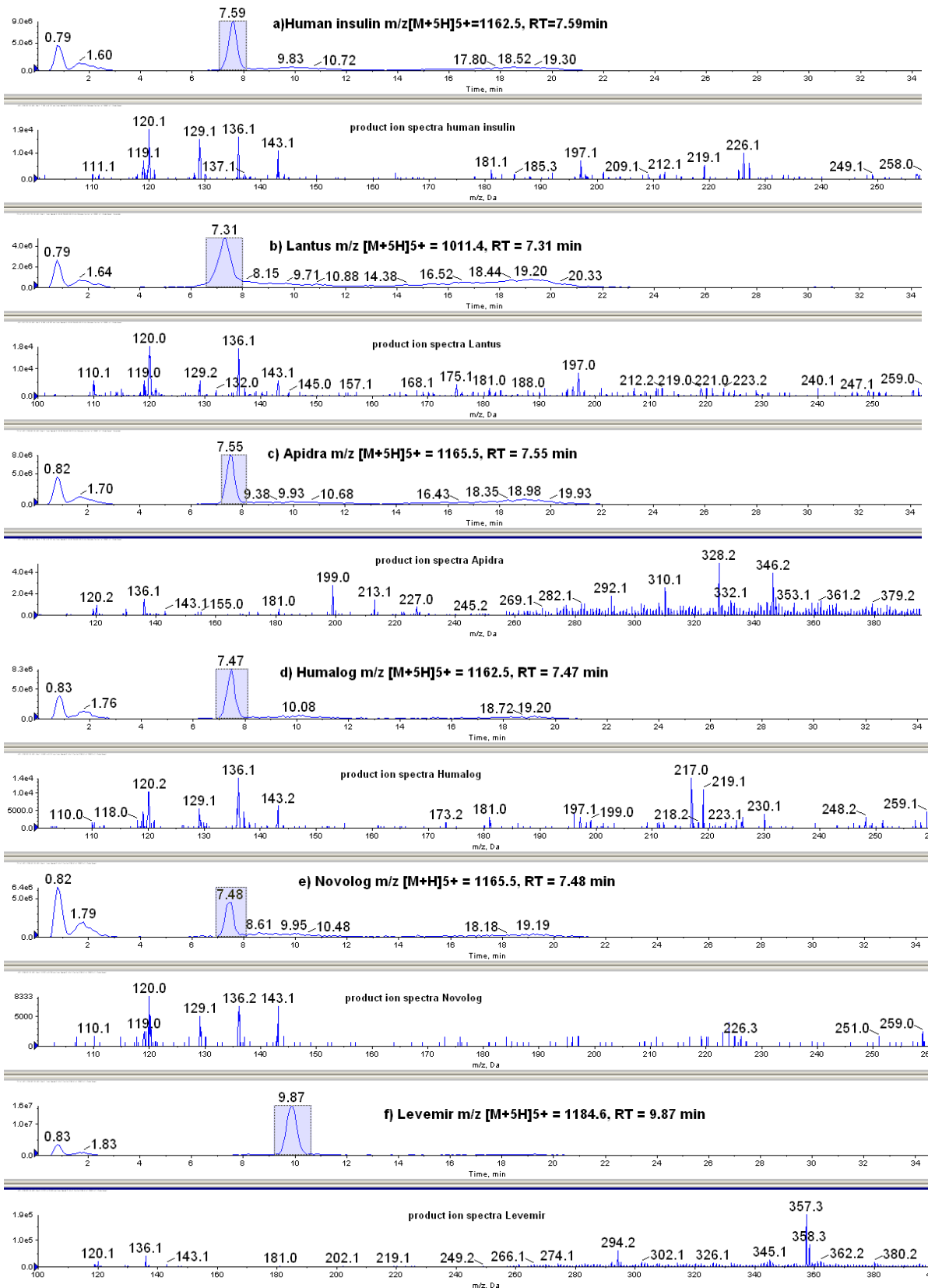


Abbildung 14: Chromatographische Trennung und Produktionenspektren von (a) humanem Insulin und seinen synthetischen Analoga (b) Lantus[®], (c) Apidra[®], (d) Humalog[®], (e) Novolog[®] und (f) Levemir[®]

4. Ergebnisse

	LoD	LoQ	Level	Intra day precision (n = 16)	Inter precision (n=16)	Wiederfindung (n = 5)	SD	Matrixeffekte (n = 5)	SD
Humanes Insulin	1,0 µU/ml	3,0 µU/ml	100 µU/ml	9,86%	13,20%	51,7 %	15,80%	101%	12,80%
			10 µU/ml	4,82%	12,10%	38,1 %	4,40%	79,30%	6,50%
Humalog	1,2 µU/ml	3,3 µU/ml	100 µU/ml	10,90%	12,80%	37,2 %	5,30%	94,70%	2,10%
			10 µU/ml	6,88%	14,80%	38,6 %	3,20%	97,40%	6,80%
Apidra	1,5 µU/ml	4,3 µU/ml	100 µU/ml	11,70%	12,80%	39,9 %	4,50%	82,70%	7,00%
			10 µU/ml	6,44%	16,70%	34,0 %	3,90%	96,40%	13,90%
Novolog	1,8 µU/ml	5,2 µU/ml	100 µU/ml	12,40%	14,10%	42,2 %	5,30%	89,60%	8,30%
			10 µU/ml	10,40%	14,10%	33,2 %	5,00%	99,60%	8,80%
Lantus	1,0 µU/ml	2,6 µU/ml	100 µU/ml	15,70%	14,10%	37,3 %	4,10%	93,70%	15,30%
			10 µU/ml	19,80%	19,80%	40,6 %	3,50%	90,00%	13,30%
Levemir	1,5 µU/ml	3,8 µU/ml	100 µU/ml	12,80%	7,75%	45,7 %	7,90%	88,20%	7,40%
			10 µU/ml	9,18%	9,82%	46,1 %	9,20%	92,50%	6,80%

Tabelle 19: Validierungsdaten der Insuline in humanem Serum: Bestimmungs- und Nachweisgrenzen, Genauigkeit, Wiederfindung und Matrixeffekte

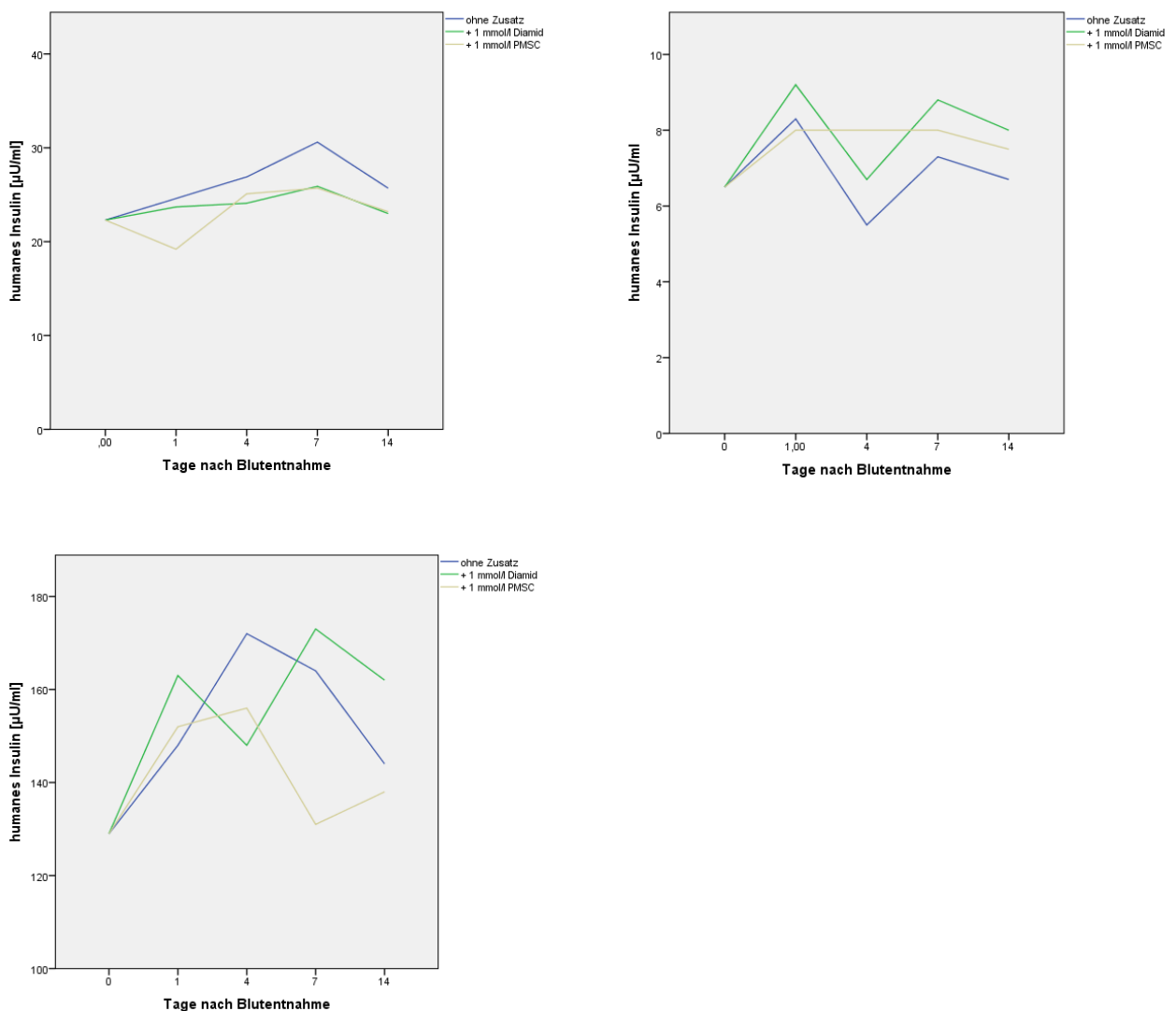


Abbildung 15: Stabilität der Konzentration von humanem Insulin in Serumproben von 3 Patienten, die bei -20°C gelagert wurden und unbehandelt oder mit IDE-Inhibitoren versetzt wurden

4. Ergebnisse

4.1.2 C-Peptid

Abbildung 16 zeigt ein Chromatogramm bei der Analyse auf C-Peptids inklusive IS im MRM Modus nach Immunoaffinitätsaufreinigung.

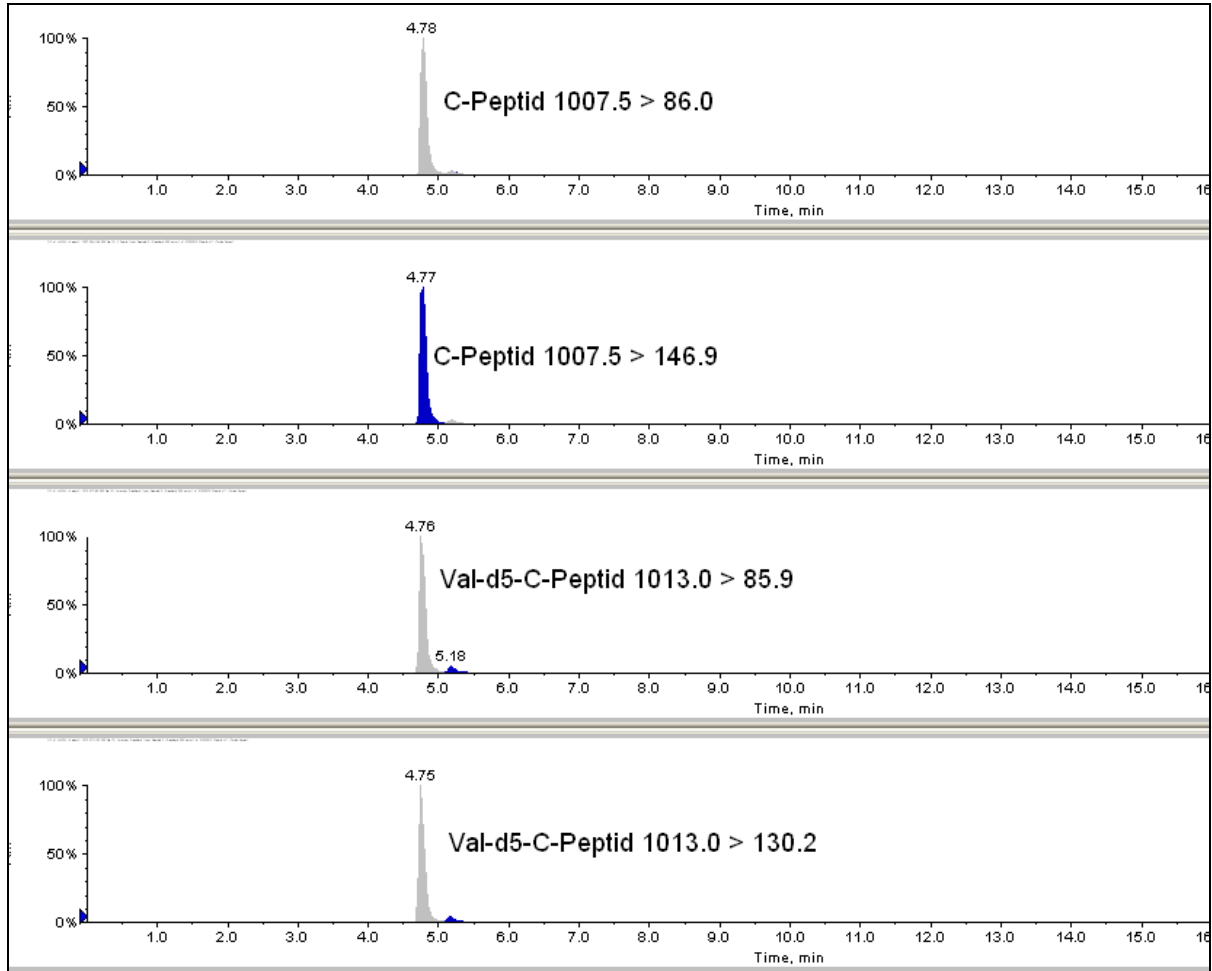


Abbildung 16: Chromatogramm der beiden Ionenübergänge im MRM-Modus für das C-Peptid und den IS Val-d₅-C-Peptid einer Plasmaprobe mit 15 ng/ml C-Peptid

Selektivität und Spezifität sind gegeben. Es gab keine interferierende Peaks in den Leermatrixproben, weiterhin störte der IS nicht bei der Detektion der Analyten. Linearität ist im Bereich von 1-50 ng/ml im Serum gegeben. Die Methodik zeigte sich aber nicht in der Lage, physiologische Konzentrationen des C-Peptids im Serum nachzuweisen. Diese liegen bei 0,2-5 ng/ml. Die errechnete LoD der Methode liegt bei 4,7 ng/ml, die LoQ bei 6,5 ng/ml. Daher wurde zur Messung der klinischen Proben auf die in 3.3.4.1 beschriebene Immunchemie zurückgegriffen.

4. Ergebnisse

4.1.3 Orale Antidiabetika

Eine Methode zur simultanen Quantifizierung von 14 antidiabetischen Arzneistoffen vom Sulfonylharnstoff-, Glinid-, Glitazon- und Gliptintyp wurde entwickelt. Abbildung 17 zeigt Chromatogramme. Wiederfindungsraten der meisten Arzneistoffe lagen zwischen 79,3% und 106 %, die Wiederfindungsraten von Vildagliptin und Saxagliptin lagen bei ungefähr 40 %. Geringe Wiederfindungsraten sind allerdings kein großes Problem, da alle Gliptine auf den Peak des ebenfalls schlecht extrahierbaren deuterierten Vildagliptins bezogen werden und vergleichbare physikochemische Eigenschaften aufweisen. Wiederfindungsraten und Matrixeffekte, die alle im akzeptablen Bereich von 75 bis 125 % lagen, sind in Tabelle 21 dargestellt. Alle sechs Leerplasmaproben waren selektiv für die Ionenübergänge aller Analyten. Die drei Leerplasmen, die mit IS versetzt wurden, waren ebenfalls selektiv. In Abbildung 17 sind Chromatogramme der Ionenübergänge im MRM dargestellt. Die Methode ist linear von den LoD bis zu hohen therapeutischen Konzentrationen und Überdosen. Die LLoD wurde definiert als die niedrigste Konzentration, die mit einer statistischen Sicherheit bei einem Signal-to-noise-Verhältnis > 3 gemessen werden kann. Dieses entscheidende Kriterium wurde für alle Analyten bei 1 ng/ml erreicht. Linearitätsbereiche und das Bestimmtheitsmaß der Arzneistoffe, die quantifiziert werden können, sind in Tabelle 17 (siehe 3.3.6.4) dargestellt. Intraday precision wurde bei drei Konzentrationen ermittelt und variierte zwischen 1,06 und 11,74 %, interday precision zwischen 2,14 und 19,05 % (Tabelle 22). Stabilität in extrahierten Proben wurde bei zwei Konzentrationen bestimmt. Alle Analyten waren im Extrakt nach 10 Stunden stabil (Tabelle 20). Die Präzision des Instruments wurde ebenfalls bei zwei Konzentrationen ermittelt, indem eine extrahierte Probe abwechselnd fünfmal innerhalb einer Sequenz und im Verlauf von 5 aufeinanderfolgenden Sequenzen injiziert wurde. Die Präzision des Instruments war für alle Analyten $< 15\%$. Die Methode wurde an 480 Realproben von Diabetikern getestet. Gemessene Konzentrationsbereiche der einzelnen Wirkstoffe werden in Tabelle 23 gezeigt.

4. Ergebnisse

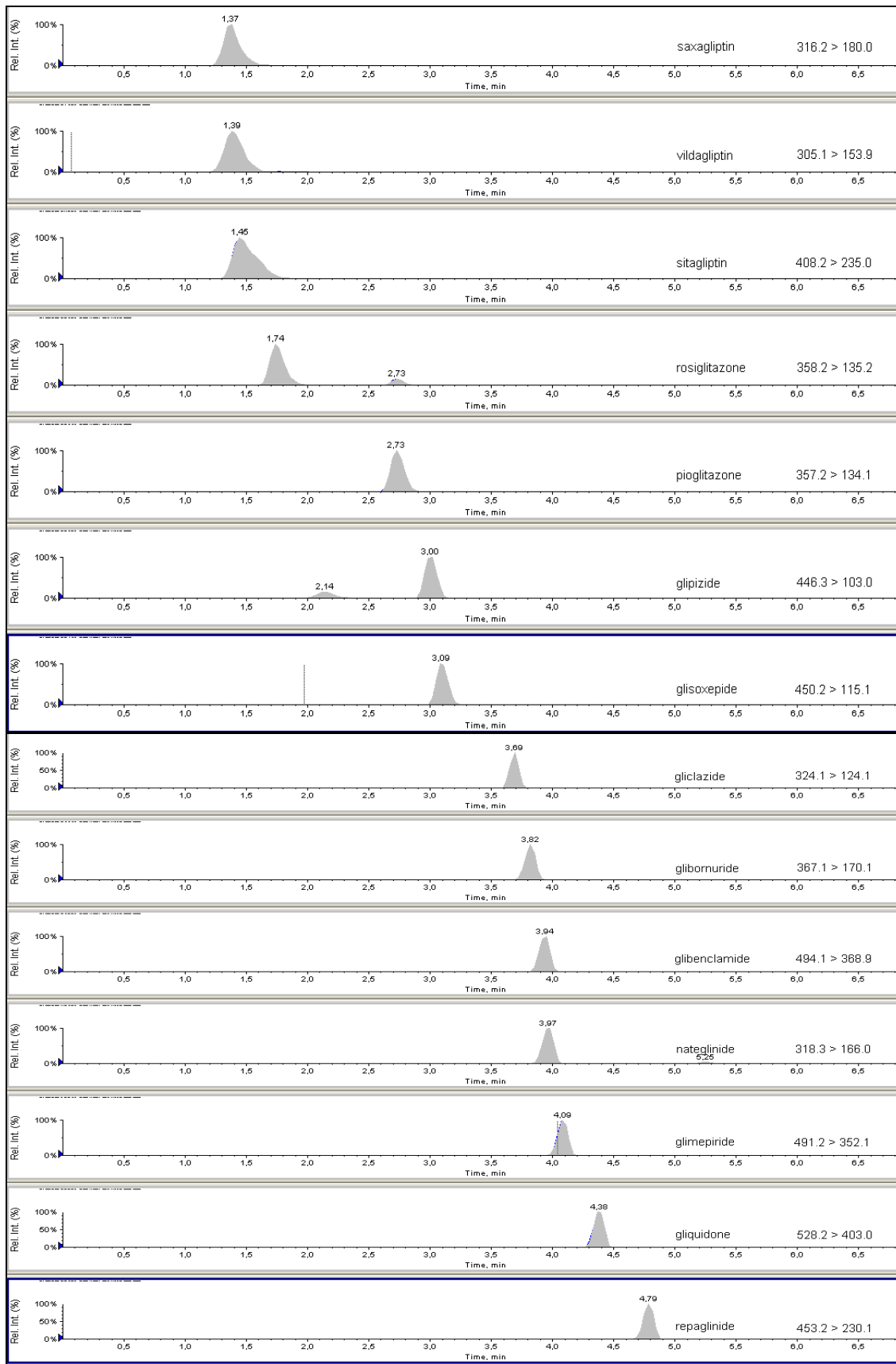


Abbildung 17: Chromatogramme der quantitativen Ionenübergänge für alle oralen Antidiabetika im MRM einer mit 50 ng/ml jedes Analyten gespickten Plasmaprobe

4. Ergebnisse

Analyt	Gespikte Konzentration (low und high) [ng/ml]	Richtigkeit [%] (n = 10)	Stabilität extrahierter Proben (n=6, t=10h); Maximaler Abfall der Regressionsgeraden
Glimepirid	30	7,4	-18,1
	1000	7,7	-10,7
Gliclazid	75	6,4	-9,67
	2500	4,3	0,63
Glipizid	10	4,4	-0,51
	750	4,4	-6,04
Glibenclamid	5	9,6	-8,32
	150	8,4	-11,6
Glibornurid	50	6,5	13,4
	750	4,7	0,35
Gliquidon	50	8,7	-17,7
	750	10,4	-4,08
Glisocepid	50	5,2	-3,62
	750	9,3	5,2
Repaglinid	2	4,1	5,85
	250	4	-0,6
Nateglinid	2	6,9	11
	250	8,1	-2,62
Rosiglitazon	2	3,9	-3,4
	250	2	-8,08
Pioglitazon	2	2,2	-3,89
	250	1,5	-4,34
Vildagliptin	5	6,5	-6,06
	200	4,1	-8,91
Sitagliptin	5	14,7	-17,7
	200	2,8	-7,04
Saxagliptin	5	5,8	-12,1
	200	2,6	-5,24

Tabelle 20: Genauigkeit des Messinstruments und Stabilitätsdaten

4. Ergebnisse

Analyt	gespikete Konzentration (low high)	gespikete Konzentration [ng/ml]	Matrixeffekte [%]	SD [%]	Wiederfindungsrate [%]	SD [%]
Glimepirid	Low	25	108,6	10,8	85,05	5,46
	High	1000	97,21	14	99,57	13,4
Gliclazid	Low	50	111,2	5,38	79,68	9,41
	High	2500	89,31	13,2	88,44	11,1
Glipizid	Low	10	94,01	5,65	79,32	14
	High	750	83,78	17,7	102,4	17,6
Glibenclamid	Low	5	93,63	3,87	84,02	10,1
	High	150	84,84	12,6	101,4	11,8
Glibornurid	Low	50	91,4	2,71	98,58	17,7
	High	750	87,02	18,2	95,6	14,5
Gliquidon	Low	50	101,5	5,8	90,59	11,3
	High	750	92,75	12,2	89,63	13,1
Glisoxepid	Low	50	129,2	6	90,1	12,4
	High	750	85,08	12,8	101,4	14,4
Repaglinid	Low	2	91,66	4,28	99,98	19,1
	High	250	78,63	7,65	102,8	11,4
Nateglinid	Low	2	106	7,86	89,89	12,4
	High	250	104,7	18,8	97,92	14,4
Rosiglitazon	Low	2	92,07	6,06	91,26	9,14
	High	250	80,3	13,2	105,7	16,4
Pioglitazon	Low	2	91,37	3,68	90,55	8,26
	High	250	83,64	10,2	103,8	13,8
Vildagliptin	Low	5	81,88	4,59	41,87	1,05
	High	200	84,83	6,41	40,62	13,2
Sitagliptin	Low	5	102,5	4,88	85,25	3,5
	High	200	80,09	10,2	79,9	5,57
Saxagliptin	Low	5	70,04	5,22	37,2	5,41
	High	200	73,48	7,23	39,2	7,88

Tabelle 21: Matrixeffekte und Wiederfindungsraten orale Antidiabetika

4. Ergebnisse

Analyt	Gespikete Konzentration [ng/ml]	Mittlere berechnete Konzentration [ng/ml] (n = 16)	Relative Standardabweichung aller 16 Proben [%]	Accuracy bias [%]	Intra precision [%; n = 16]	day (RSD) Inter precision [%; n = 16]	day (RSD)
Glimepirid	25 (Low)	24,42	13,8	2,33	11,7	13,9	
	250 (Middle)	255,3	13,9	2,1	8,94	14,2	
	1000 (high)	1041	12,8	4,11	6,09	13,1	
Gliclazid	50 (Low)	50,98	11,3	1,96	7,84	11,6	
	500 (Middle)	538,8	8,37	7,77	7	8,46	
	2500 (High)	2382	10,8	4,73	7,07	11	
Glipizid	10 (Low)	10,43	9,44	4,33	8,04	9,54	
	100 (middle)	92,62	6,17	7,38	7,87	7,87	
	750 (High)	778,2	7,46	3,76	5,36	7,59	
Glibenclamid	5 (Low)	5,018	9,56	0,36	8,05	9,66	
	50 (middle)	52,77	8,39	5,53	8,01	8,41	
	150 (High)	162,5	10,9	8,35	7,48	11,1	
Glibornurid	50 (Low)	39,72	7,76	0,55	5,98	7,88	
	150 middle)	148,4	7,51	1,1	7,91	7,91	
	750 (High)	786,9	8,59	4,91	5,35	8,78	
Gliquidon	50 (Low)	51,68	9,39	3,36	8,75	9,44	
	150 (middle)	144,5	9,85	3,82	8,1	9,97	
	750 (High)	764,8	9,88	1,97	8,34	9,98	
Glisoxepid	40 (Low)	39,72	6,9	0,7	7,99	7,99	
	200 (middle)	195,3	8,99	2,36	9,58	9,58	
	750 (High)	745,4	8,9	0,62	8,03	8,96	
Repaglinid	2 (Low)	2,236	8,52	11,8	5,99	8,67	
	25 (middle)	27,58	5,42	10,3	5,52	5,52	
	250 (High)	239,8	8,29	4,07	8,03	8,3	
Nateglinid	2 (Low)	1,896	15,6	2,37	7,35	14	
	25 middle)	21,66	18,6	10,1	10,1	19,1	
	250 (High)	218,4	10,5	1,47	10,6	10,6	
Rosiglitazon	2 (Low)	2,047	8,64	5,18	8,26	8,66	
	25 Middle)	27,51	8,8	13,4	7,74	8,87	
	250 (High)	253,7	7,43	12,7	4,66	7,59	
Pioglitazon	2 (Low)	1,878	12,8	6,11	10,1	13	
	25 (middle)	29,37	9,47	17,5	5,18	9,7	
	250 (High)	276,3	8,81	10,5	5,46	8,97	
Vildagliptin	5 (Low)	5,22	28,9	4,4	21,7	29,3	
	50 (middle)	51,18	16,7	2,36	15,2	16,8	
	200 (High)	167,9	25,3	16	11,7	26	
Sitagliptin	5 (Low)	4,957	2,09	0,86	1,06	2,14	
	50 (middle)	39,37	12,2	21,3	9,1	12,4	
	200 (High)	153,7	11,8	23,1	9,54	12	
Saxagliptin	5 (Low)	5,181	16,8	3,67	16,7	16,8	
	50 (middle)	53,95	16,4	7,91	15	16,5	
	200 (High)	201,2	18,5	0,59	15,5	18,7	

Tabelle 22: Genauigkeitsdaten orale Antidiabetika

4. Ergebnisse

Wirkstoff	n	Mittelwert	Minimum	Maximum
Glimepirid	45	15	< LoQ	174
Glibenclamid	8	8,02	< LoQ	40,2
Gliquidon	1	65,2		
Sitagliptin	58	98,3	< LoQ	670
Vildagliptin	3	16,9	9,96	27,3
Pioglitazon	4	228	31,3	488
Rosiglitazon	1	< LoQ		

Tabelle 23: Gemessene Konzentrationsbereiche der oralen antihyperglykämischen Wirkstoffe bei diabetischen Patienten

4.1.4 Methylglyoxal

Da MG ein sehr reaktives Dicarbonyl ist, war die Flüssigkeitschromatographie ohne vorherige schützende Derivatisierung nicht möglich. 2,3-Diaminonaphthalen wurde als Derivatisierungsmittel gewählt. Die Proben werden nach Fällung über Nacht bei 4 °C zu stabilen und nicht reaktiven Derivaten derivatisiert (Abbildung 12, 3.3.7.3). Nach 8 h waren die Peakflächen des derivatisierten MG und des derivatisierten IS konstant und die Derivatisierung konnte als abgeschlossen betrachtet werden. Die Naphtopyrazin-Derivate sind unpolar und können über eine Reversed phase C₁₂ Säule getrennt werden. Abbildung 18 zeigt ein Chromatogramm einer Analyse. Die Methode erlaubt einen guten Durchsatz aufgrund eines schnellen chromatographischen Gradienten mit einer Gesamtanalysenzeit von 10 Minuten. Für die massenspektrometrische Detektion wurden ESI und APCI sowohl im positiven als auch im negativen Modus verglichen, ESI im positiven Modus ergab die besten Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Selektivität.

Das endogene Vorkommen von MG erschwerte die Strategie für die Detektion störender Signale im Zuge der Selektivitätsbestimmung. Alle Serum- und post mortem Blutproben enthielten MG. Für die Detektion des IS ist Selektivität gegeben. Die Methode zeigte eine gute Sensitivität mit einer LoD von 1,3 ng/ml und einer LoQ von 3,2 ng/ml. Die meisten Konzentrationen in Realproben lagen zwischen 5 und 100 ng/ml. Die Methode ist über den gesamten Kalibrationsbereich (5 bis 500 ng/ml) linear. Korrelationskoeffizienten waren immer $R > 0.99$. Wässrige Kalibrationen konnten nicht mit Matrixkalibrationen (Serum oder post mortem Femoralblut) nach Subtraktion der endogenen MG Konzentrationen verglichen werden, daher wurde in der Routineanalytik auf eine Matrixkalibration und das Standardadditionsverfahren zurückgegriffen. Die Genauigkeit der Methode im niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationsbereich war in Übereinstimmung mit den GTFCh-Richtlinien: intra day precision war 10,3 %, 9,2 %

4. Ergebnisse

und 8,3 %, inter day precision 15,3 %, 14,2 % und 9,4 %, der Richtigkeitsfehler -5,7 %, -3,0 % und 7,4 %. Stabilität (Abnahme der Konzentration < 20%) von MG im Serum ist bis mindestens 4 Wochen nach Probennahme unter angemessenen Lagerungsbedingungen (-20°C) gegeben.

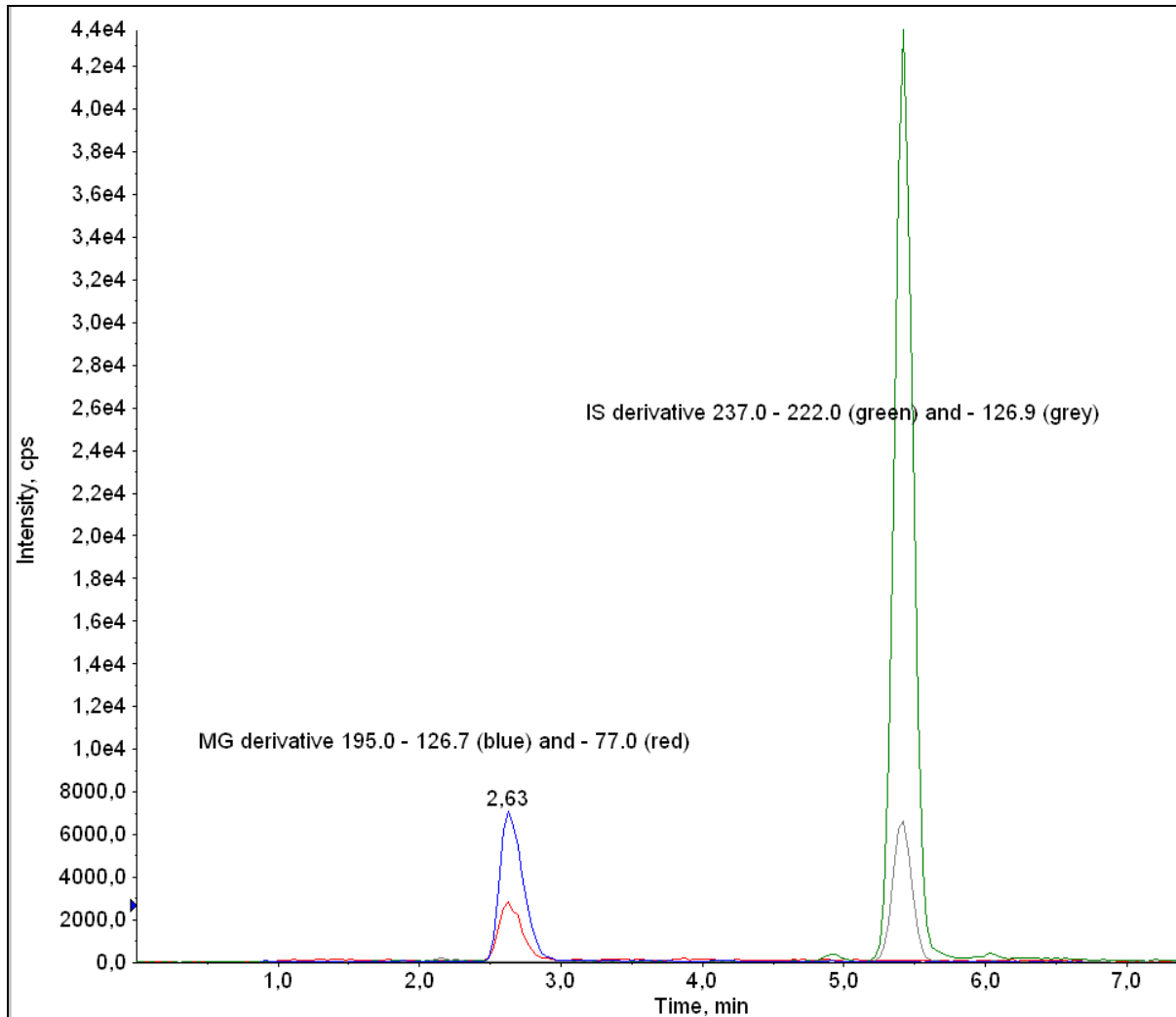


Abbildung 18: Chromatogramm einer realen Serumprobe mit 123 ng/ml MG (detektiert über das Derivat mit Masse 195 in blauem und rotem Chromatogramm); Derivat des IS 3,4-Hexandion (Masse 237 in grünem und grauem Chromatogramm)

4.1.5 Anhydroglucitol

Da AG ein sehr polarer Zucker ist, können reversed-phase HPLC-Säulen AG nicht retenieren. Eine Aminosäule wurde gewählt und kann AG und den IS während eines 6 minütigen Runs für 2 min retenieren (Abbildung 19). Die Methode erlaubt einen hohen Durchsatz aufgrund des schnellen Fällungsschritts und der kurzen chromatographischen Trennung. Für die massenspektrometrische Detektion wurden

4. Ergebnisse

APCI und ESI im positiven und negativen Modus verglichen. APCI im negativen Modus ergab die besten Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität und Selektivität. Die LC-MS/MS-Methodik wurde erfolgreich in humanem Serum und post mortem FVB validiert. Alle sechs Serum- und post mortem Blutproben enthielten AG. Für die Detektion des IS ist Selektivität gegeben, wässrige Lösungen des IS enthielten keine Spuren des Analyten. Die Grenzen der Methode liegen bei $LoD = 0,20 \mu\text{g/ml}$ und $LoQ = 0,55 \mu\text{g/ml}$.

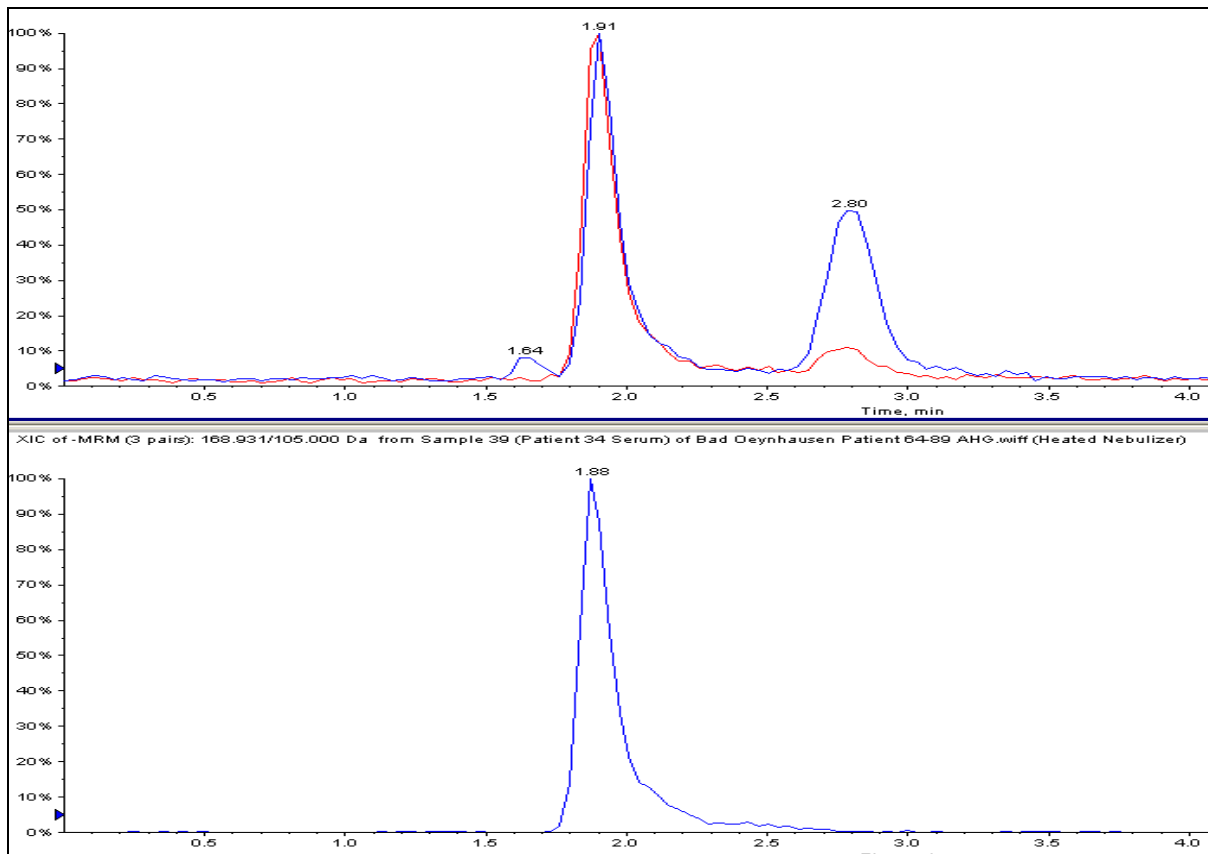


Abbildung 19: LC-MS/MS Ergebnisse Anhydroglucitol: Chromatogramm des Serum eines diabetischen Patienten mit $23.7 \mu\text{g/ml}$ AG. Die oberen zwei Ionenübergänge stellen AG bei 1,91 min dar, der untere Ionenübergang zeigt den IS bei 1,88 min.

Der Assay ist linear innerhalb des Kalibrierbereiches ($1,0 \mu\text{g/ml}$ bis $50 \mu\text{g/ml}$). Korrelationskoeffizienten waren immer $R > 0,99$. Die wässrige Kalibration und die Matrixkalibration nach Subtraktion der endogenen Konzentrationen zeigten Steigungsgleichheit. Serum [$y = (0,00789 \pm 0,00248) x$] und postmortem Femoralblut [$y = (0,00802 \pm 0,00182)x$] zeigten ebenfalls Steigungsgleichheit (jeweils $n = 6$). Daher kann für die Routineanalytik eine wässrige Kalibrierung empfohlen werden. Genauigkeitsdaten bei drei Konzentrationen lagen innerhalb der geforderten Grenzen:

4. Ergebnisse

intra day precision 13,6 %, 2,7 % und 1,9 %, inter day precision 13,6 %, 3,6 % und 3,7 %, Richtigkeit 9,9 %, 0,5 % und -1,9 %. Die Wiederfindungsraten im Serum waren 89,8 % im unteren (2,5 µg/ml) und 76,3 % im höheren Konzentrationsbereich (25 µg/ml). Im postmortem FVB lagen die Wiederfindungsraten niedriger (75,7 % bei 2,5 µg/ml und 70,8 % bei 25 µg/ml). Matrixeffekte lagen innerhalb der geforderten Grenzen, obwohl ion enhancement gezeigt werden konnte: 107 % im unteren (2,5 µg/ml) und 122 % im höheren Konzentrationsbereich (25 µg/ml). Postmortem FVB zeigte jedoch Ionensuppression (93,7% bei 2,5 µg/ml und 85,1% bei 25 µg/ml). Stabilität (Abfall der Peakflächen um < 20%) von AG ist für mindestens zwei Wochen nach Probenentnahme gegeben. Die Kriterien für Stabilität nach dem Tod wurden für mindestens einen Monat erfüllt. Das Verhältnis Vollblut/Serum lag bei 0,804 (n = 20, Bereich 0,667-0,967, SD 0,079).

4.2 Klinische Proben

4.2.1 Glucose

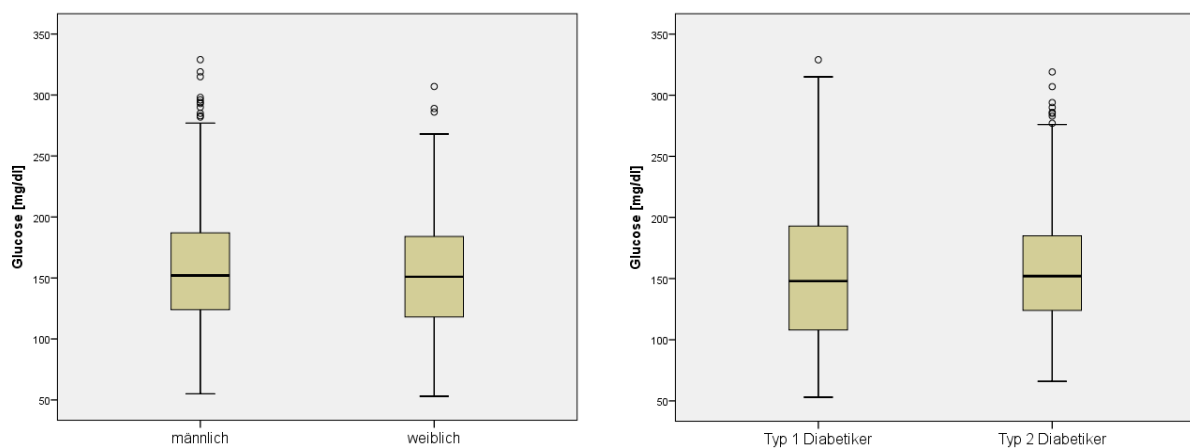


Abbildung 20: Glucosekonzentrationen in klinischen Proben Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich

450 Diabetiker wurden auf ihren glykämischen Status untersucht, im Mittel ergab sich eine Nüchtern-Glucose-Serumkonzentration von 159 mg/dl (53-329 mg/dl; SD 50,6 mg/dl; n = 450). Nur 101 Patienten (22,3 %) wurden in einem normoglykämischen Zustand (Nüchtern-Glucose-Serumkonzentration 65-120 mg/dl)

4. Ergebnisse

erfasst. Die Mehrzahl der Patienten ($n = 346$; 76,8 %) wiesen eine Hyperglykämie auf (> 120 mg/dl im nüchternen Zustand), nur drei Patienten (0,7 %) waren hypoglykämisch (< 65 mg/dl). Typ 1- ($n = 109$) und Typ 2- ($n = 323$) Diabetiker zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,388$), ebensowenig männliche ($n = 305$) und weibliche ($n = 145$) Diabetiker ($p = 0,638$). Abbildung 20 macht dies anhand von Boxplots deutlich.

4.2.2 HbA1c

Die diabetischen Patienten zeigten HbA1c-Konzentrationen von 8,81 % (MW; 4,30-17,3 %; SD 1,8 %; $n = 470$). Typ 1- ($n = 113$) und Typ 2- ($n = 337$) Diabetiker zeigten keine signifikanten ($p = 0,639$) Unterschiede, ebensowenig männliche ($n = 317$) und weibliche ($n = 152$) Diabetiker ($p = 0,555$). Abbildung 21 macht dies anhand von Boxplots deutlich.

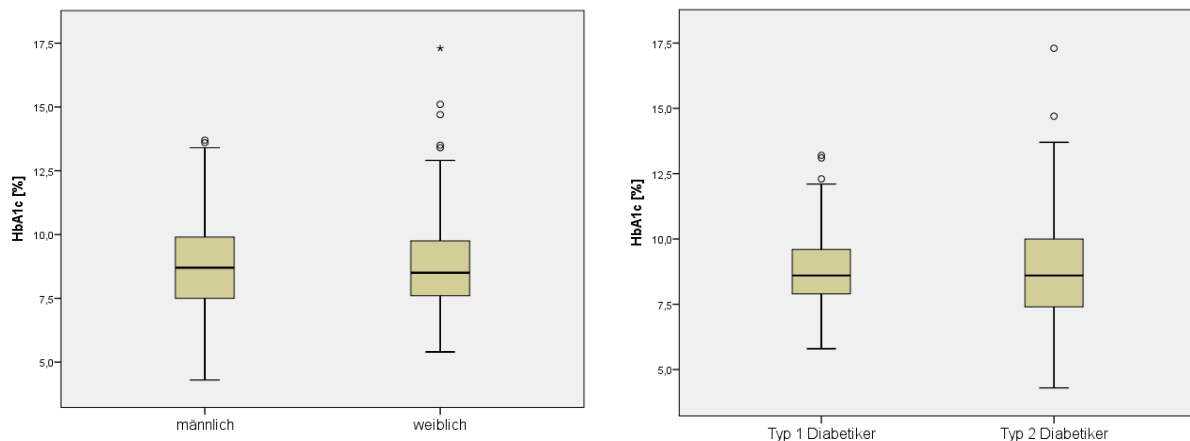


Abbildung 21: HbA1c-Konzentrationen in klinischen Proben von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich

4.2.3 Fructosamin

Die diabetischen Patienten zeigten Fructosamin-Konzentrationen von 346 $\mu\text{mol/l}$ (MW; 181-696 $\mu\text{mol/l}$; SD 89,3 $\mu\text{mol/l}$; $n = 475$). Typ 1- (MW 376 $\mu\text{mol/l}$; 244-627 $\mu\text{mol/l}$; SD 88,0 $\mu\text{mol/l}$; $n = 113$) und Typ 2- (MW 336 $\mu\text{mol/l}$; 181-696 $\mu\text{mol/l}$; SD 86,3 $\mu\text{mol/l}$; $n = 341$) Diabetiker zeigten signifikant unterschiedliche Fructosamin-Konzentrationen ($p < 0,0001$). Zwischen männlichen ($n = 319$) und weiblichen ($n = 154$) Diabetikern gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,730$). Abbildung 22 macht dies anhand von Boxplots deutlich.

4. Ergebnisse

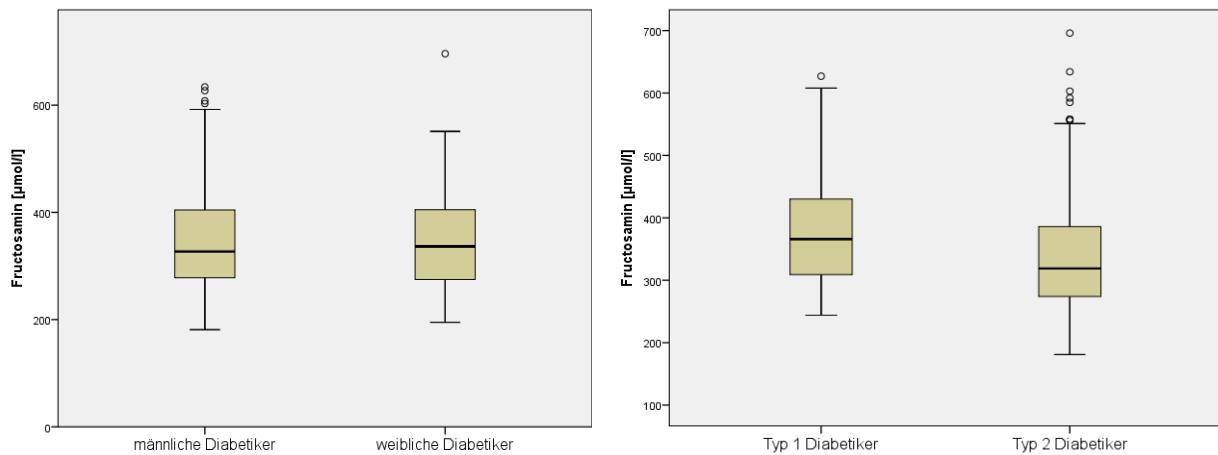


Abbildung 22: Fructosamin-Konzentrationen in klinischen Proben von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich

4.2.4 Humanes und synthetische Insuline

4.2.4.1 Humanes Insulin

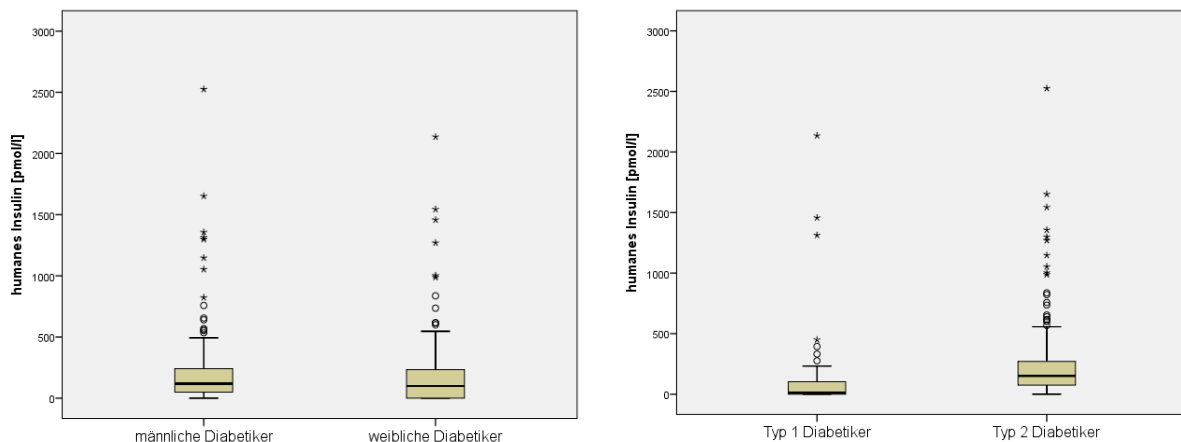


Abbildung 23: Konzentrationen von humanem Insulin in klinischen Proben von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich (ohne Ausreißer bei 32391 pmol/l)

Konzentrationen von humanem Insulin bei Diabetikern lagen im Mittel bei 293 pmol/l (MW; 0-32391 pmol/ml; SD 1765 pmol/l; n = 343). Referenzbereiche für Nicht-Diabetiker liegen bei 29-188 pmol/l. Es zeigte sich kein signifikanter ($p = 0,409$) Unterschied in den Humaninsulinkonzentrationen bei Aufteilung der Probanden nach Geschlecht. Männer zeigten einen Mittelwert von 333 pmol/l (0-32391 pmol/l; SD 2137 pmol/l; n = 231), Frauen zeigten einen Mittelwert von 212 pmol/l (0-2135 pmol/l; SD 342 pmol/l; n = 112). Typ 2-Diabetiker (MW 361 pmol/l; 0-32391 pmol/l;

4. Ergebnisse

SD 2056 pmol/l; n = 250) zeigten aber signifikant ($p < 0,0001$) erhöhte Humaninsulin-Konzentrationen im Vergleich mit Typ 1-Diabetikern (MW 119 pmol/l; 0-2135 pmol/l; SD 321 pmol/l; n = 81). Abbildung 23 zeigt Boxplots. Tabelle 24 zeigt die Mittelwerte der einzelnen nach Medikation eingeteilten Kollektive. Die Verteilung der Humaninsulin-Konzentrationen über die Kollektive war nicht gleich ($p < 0,0001$). Die Injektion von humanem Insulin oder die Einnahme von oralen Antidiabetika erhöhen die Humaninsulin-Konzentrationen signifikant. Eine Therapie mit synthetischem Insulin vermindert die körpereigene Insulinproduktion signifikant. Abbildung 24 zeigt einen Boxplot.

Gruppe	Mittelwert [pmol/l]	n	Minimum [pmol/l]	Maximum [pmol/l]	SD [pmol/l]
Diabetiker ohne Medikation	135	58	7,21	470	104
Diabetiker; Therapie mit humanem Insulin	1475	30	26,4	32391	5865
Diabetiker; nur orale Antidiabetika nachgewiesen	202	45	< LoQ	1003	196
Diabetiker; Nachweis synthetischer Insuline	77,2	73	< LoQ	757	139

Tabelle 24: Konzentrationen von humanem Insulin der nach Medikation eingeteilten Kollektive

4. Ergebnisse

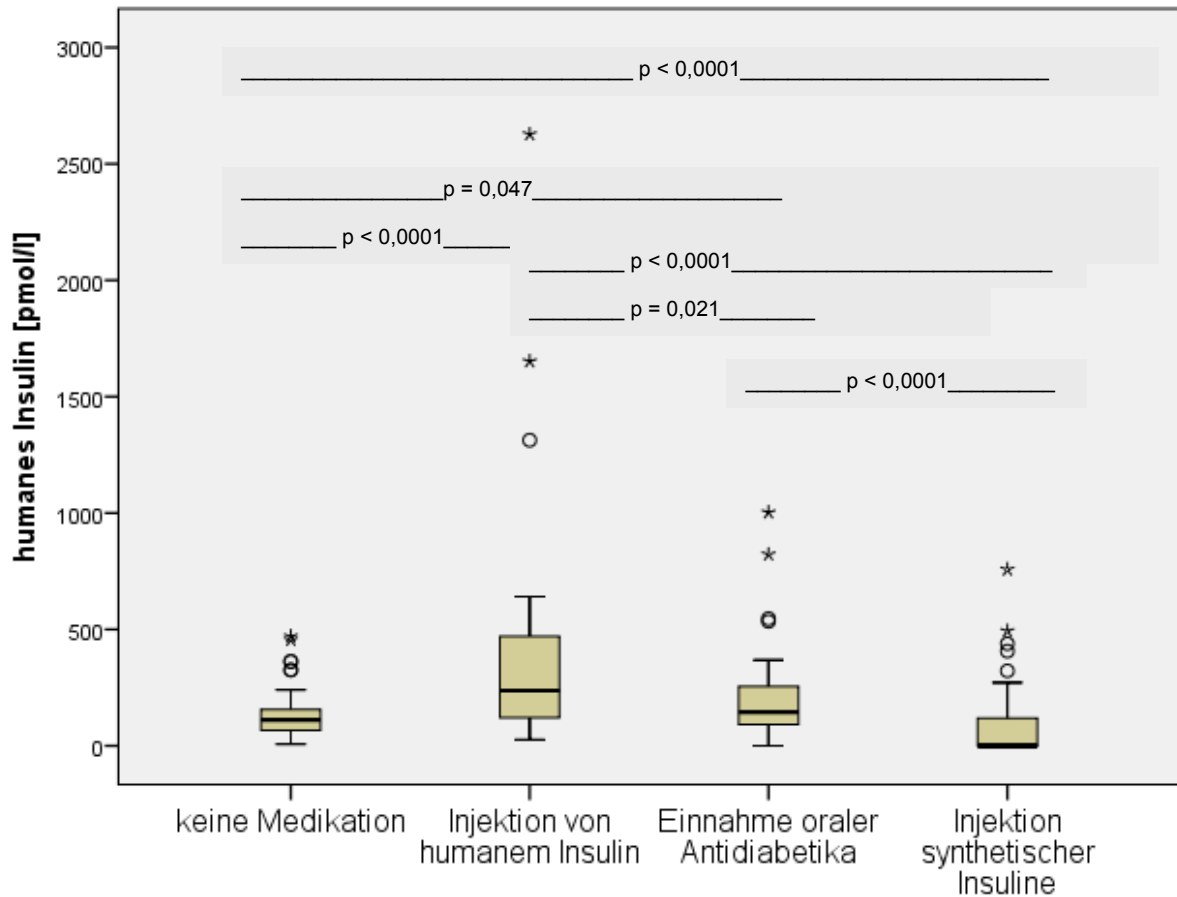
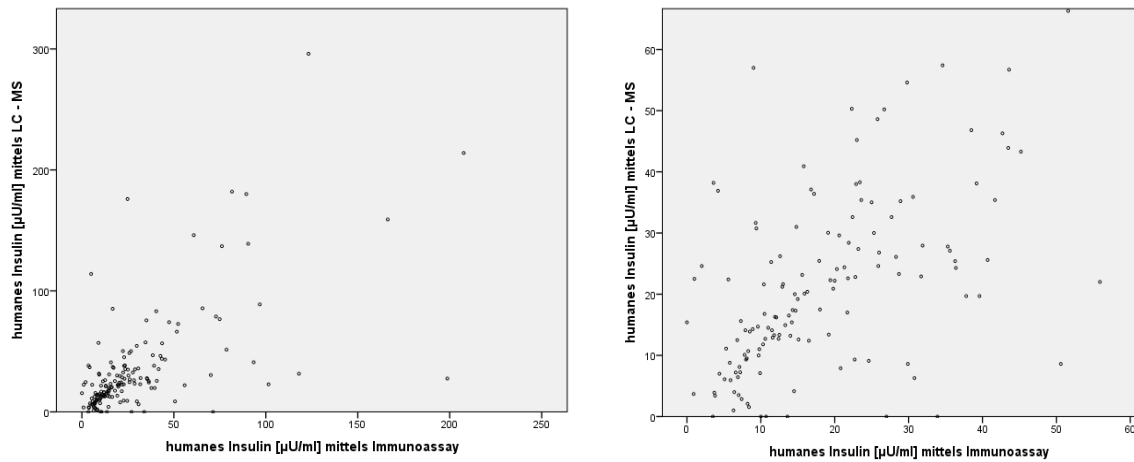


Abbildung 24: Konzentrationen von humanem Insulin der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive

4.2.4.2 Vergleich der immunchemischen mit der chromatographischen Methode

Bei Vergleich der Ergebnisse von immunchemischer und chromatographischer Methoden (Abbildung 25, n = 202) zeigten sich erhebliche Abweichungen und nur eine schwache Korrelation. Ein Bland-Altman-Plot wurde angefertigt, der die beiden Messmethoden graphisch besser darstellen sollte. Dabei wird das Mittel der beiden gemessenen Konzentrationen (x-Achse), das als beste Annäherung für die reale Konzentration angenommen wird, gegen die Differenz der beiden Konzentrationen (y-Achse) aufgetragen.

4. Ergebnisse



$R = 0,639$; $R^2 = 0,409$; $p < 0,0001$; $n = 202$

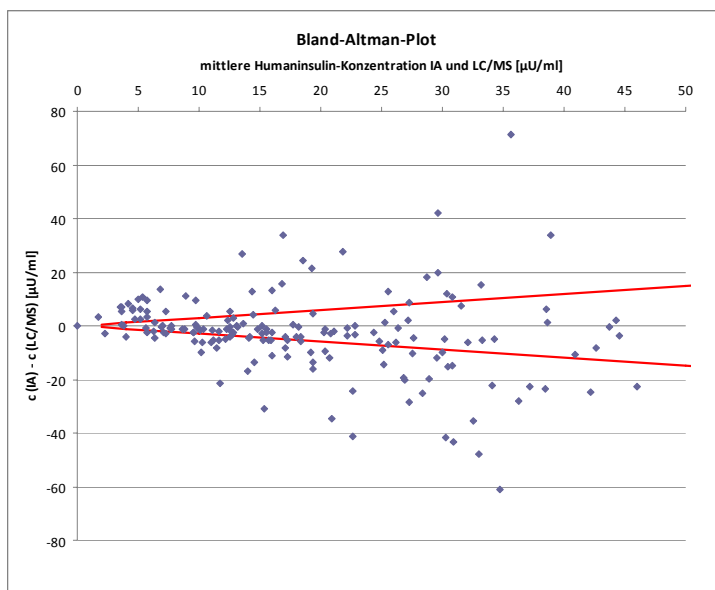


Abbildung 25: Vergleich der beiden Methoden: oben links Korrelation, oben rechts Korrelation in kleinerem Maßstab; unten Bland-Altman-Plot (rotes Akzeptanzintervall 20 %)

4.2.4.3 Synthetische Insuline

Mit der entwickelten Methode konnten neben humanem Insulin auch die beschriebenen synthetischen Insuline im Serum nachgewiesen werden. Tabelle 25 zeigt die gemessenen Konzentrationen der synthetischen Insuline bei den Diabetikern.

4. Ergebnisse

	n	MW [μ U/ml]	Minimum [μ U/ml]	Maximum [μ U/ml]
Novolog	26	51,1	< LoQ	181
Apidra	15	54,9	< LoQ	130
Lantus	9	95,2	20,7	191
Levemir	46	118	10,7	393
Humalog	42	77	12	175

Tabelle 25: Konzentrationen in klinischen Serumproben von Diabetikern mit synthetischen Insulinen

4.2.5 C-Peptid

Die Diabetiker zeigten im Mittel C-Peptidkonzentrationen von 1077 pmol/l (MW; < LoQ-6620 pmol/l; SD 1161 pmol/l; n = 402). Dabei wurde deutlich, dass bei Aufteilung der diabetischen Probanden nach Geschlecht männliche Diabetiker (MW 1131,36 pmol/l; < LoQ-6620 pmol/l; SD 1166 pmol/l; n = 269) leicht signifikant ($p = 0,018$) erhöhte C-Peptid-Konzentrationen im Vergleich zu weiblichen Teilnehmern zeigten (MW 835,5 pmol/l; < LoQ-4340 pmol/l; SD 888,8 pmol/l; n = 133) (Abbildung 26). Typ 2-Diabetiker (MW 1404 pmol/l; < LoQ-6620 pmol/l; SD 1078 pmol/l; n = 284), bei denen die Proinsulin-Sekretion und dementsprechend auch die C-Peptid-Sekretion noch intakt ist, zeigten signifikant ($p < 0,0001$) höhere C-Peptid-Konzentrationen als Typ 1-Diabetiker (MW 109,6 pmol/l; < LoQ-3153 pmol/l; SD 348,7 pmol/l ; n = 97), bei denen die endogene Sekretion weitestgehend eingestellt ist (Abbildung 26). Tabelle 26 und Abbildung 27 zeigen die Mittelwerte der nach Medikation eingeteilten Kollektive. Die Verteilung der C-Peptid-Konzentrationen über die Stichproben war nicht gleich ($p < 0,0001$). Sulfonylharnstoffe und andere orale Antidiabetika erhöhen aufgrund ihres Wirkmechanismus die C-Peptid-Konzentrationen signifikant. Eine Therapie mit synthetischem oder humanem Insulin hat keinen Einfluss auf die mittleren C-Peptid-Konzentrationen.

4. Ergebnisse

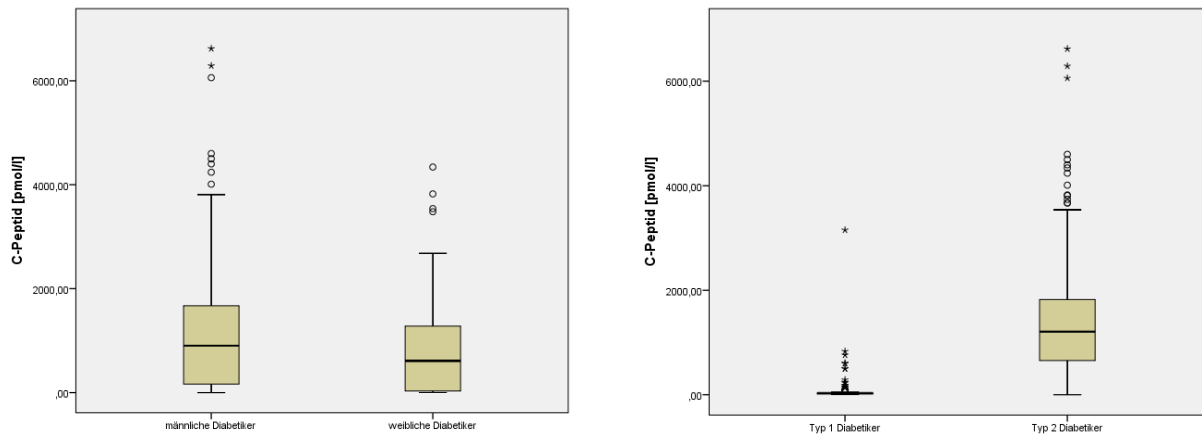


Abbildung 26: C-Peptid-Konzentrationen in klinischen Proben von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich

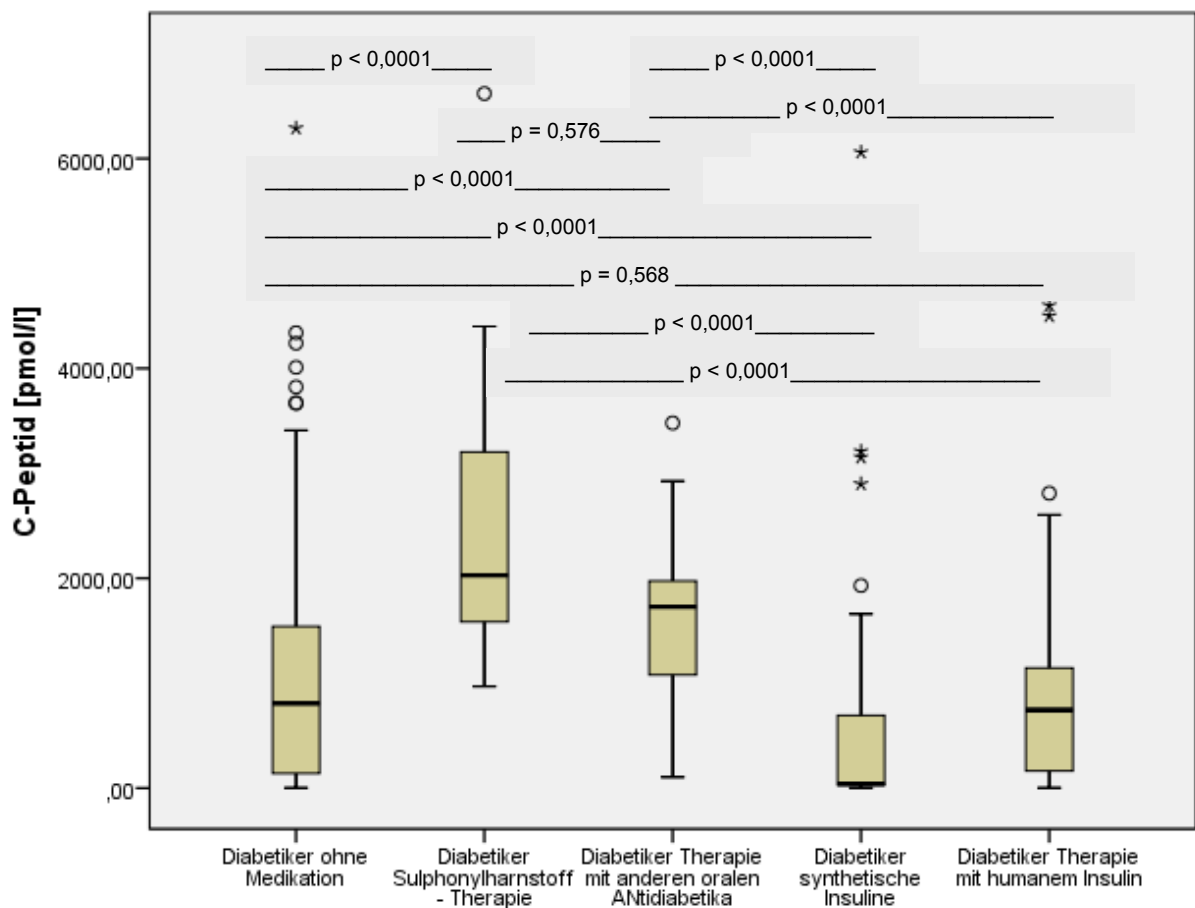


Abbildung 27: C-Peptid-Konzentrationen der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive

4. Ergebnisse

Gruppe	Mittelwert [pmol/l]	Median [pmol/l]	Minimum [pmol/l]	Maximum [pmol/l]	SD [pmol/l]
Diabetiker ohne Medikation	1027	808	< LoQ	6290	1093
Diabetiker Sulphonylharnstofftherapie	2465	2028	970	6620	1293
Diabetiker Therapie andere orale Antidiabetika	1653	1728	106	3480	823
Diabetiker Therapie synthetische Insuline	495	430	< LoQ	6060	943
Diabetiker Therapie mit humanem Insulin	891	745	< LoQ	4600	928

Tabelle 26: C-Peptid-Konzentrationen von Diabetikern eingeteilt nach ihrer Therapie

4.2.6 Das molare Verhältnis humanes Insulin:C-Peptid

Gruppe	Mittelwert [pmol/l]	n	Minimum [pmol/l]	Maximum [pmol/l]	SD [pmol/l]
Diabetiker ohne Medikation	0,13	58	< (Ins.) LoQ	0,59	0,13
Diabetiker Therapie mit humanem Insulin	18,4	30	0,22	438	79,6
Diabetiker nur orale Antidiabetika nachgewiesen	0,13	86	< (Ins.) LoQ	1,1	0,15
Diabetiker Nachweis synthetischer Insuline	0,1	74	< (Ins.) LoQ	1,2	0,2

Tabelle 27: Konzentrationen des I:C-Verhältnisses der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive

Das molare Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid (I:C) wurde berechnet, indem die Konzentrationen von humanem Insulin und C-Peptid in pmol/l ins Verhältnis gesetzt wurden. I:C lag im Mittel bei den Diabetikern bei 4,58 (MW; 0-712; SD = 42,1; n = 409). Die I:C-Verhältnisse unterschieden sich nicht signifikant (p = 0,824) zwischen Typ 1- (MW 19,1; Median 0,094; 0-712; SD = 91,2; n = 85) und Typ 2-

4. Ergebnisse

Diabetikern (MW 0,53; Median 0,12; 0-26,1; SD = 2,29; n = 304). Abbildung 27 zeigt Boxplots. Tabelle 27 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Kollektive „Medikation“. Die Verteilung der I:C-Verhältnisse über die Stichproben war nicht gleich ($p < 0,0001$). Die Injektion von humanem Insulin erhöht die I:C-Verhältnisse signifikant. Die Einnahme von oralen Antidiabetika dagegen verändert die I:C-Verhältnisse im Vergleich zu Diabetikern ohne Medikation nicht, da orale Antidiabetika aufgrund ihres Wirkmechanismus sowohl die Humaninsulin als auch die C-Peptidkonzentrationen ansteigen lassen. Eine Therapie mit synthetischem Insulin verringert die I:C-Verhältnisse minimal. Die Boxplots sind in Abbildung 28 dargestellt.

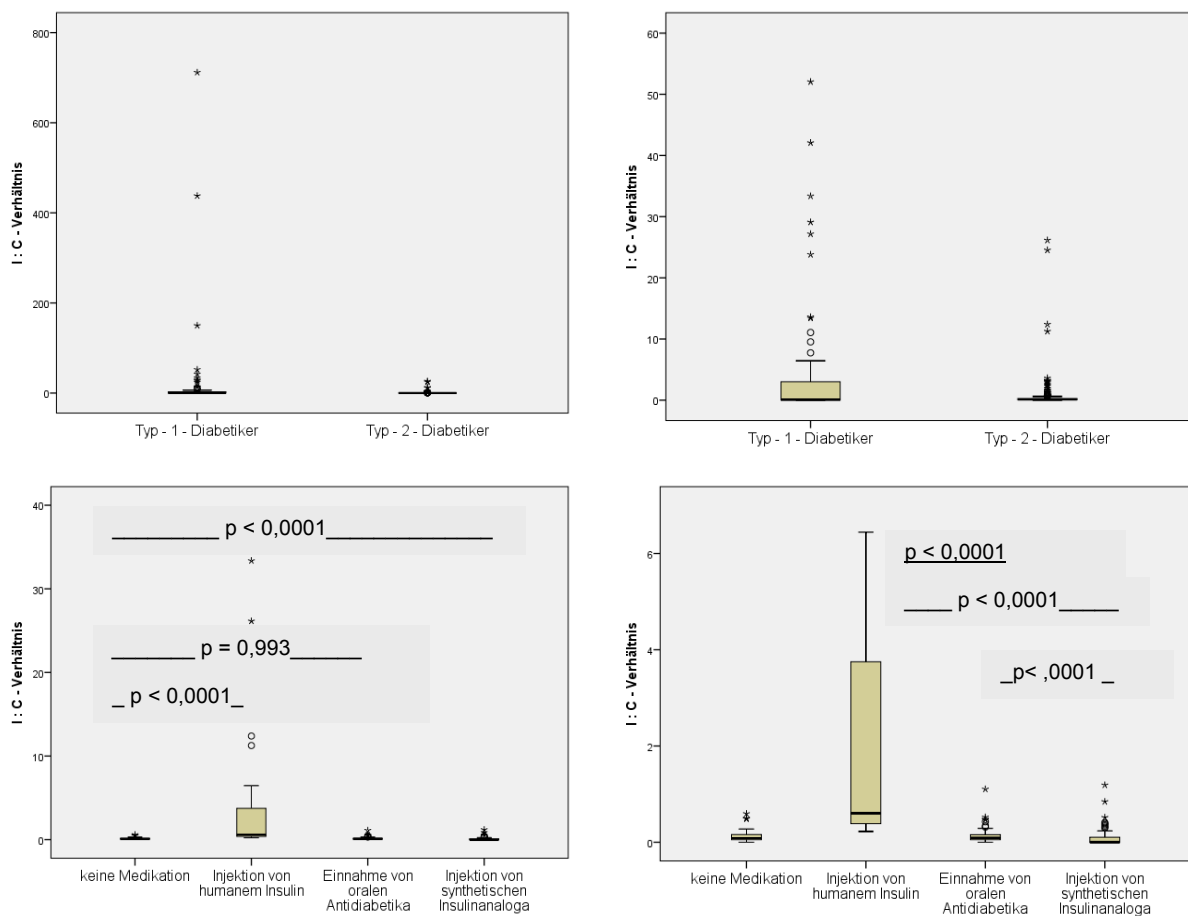


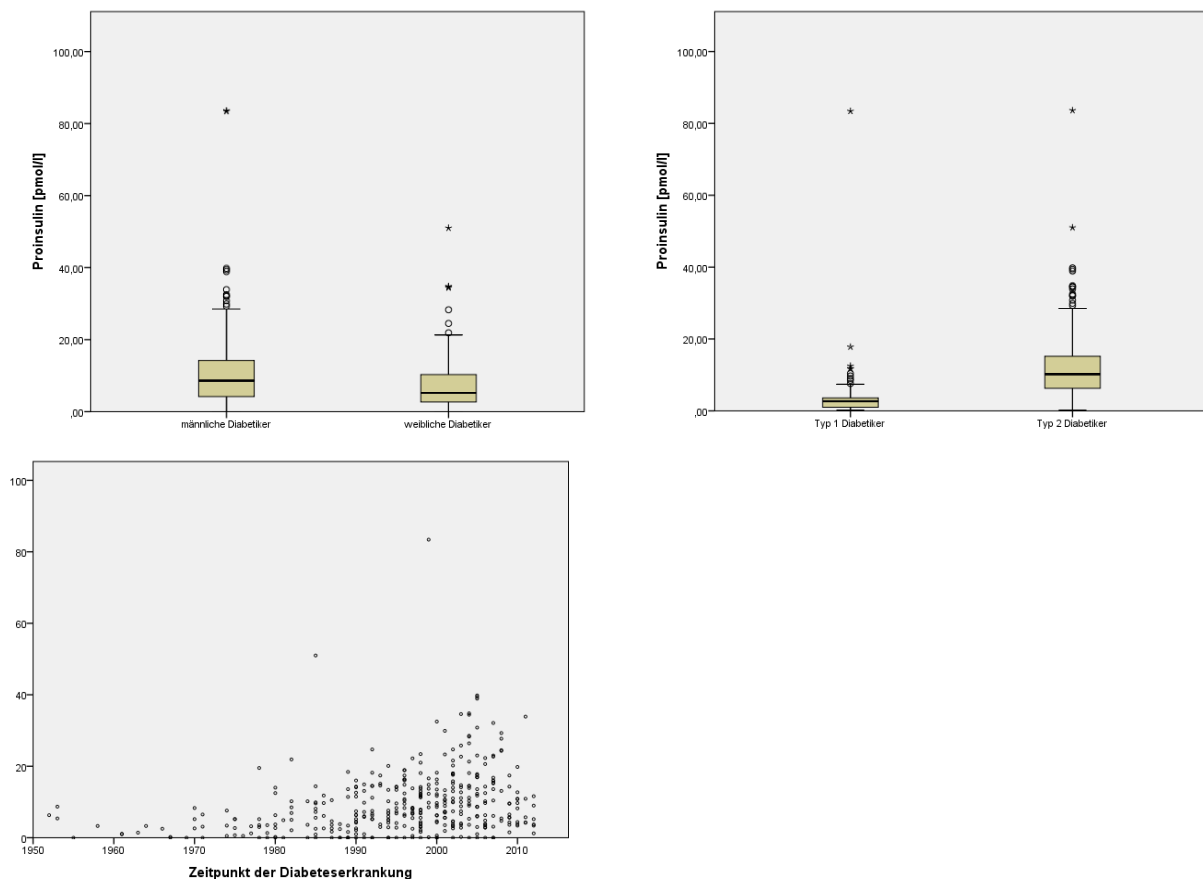
Abbildung 28: I:C-Verhältnisse von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern im Vergleich und eingeteilt nach ihrer Medikation (unten, rechts vergrößert)

4.2.7 Proinsulin

Proinsulin-Konzentrationen von Diabetikern lagen im Mittel bei 9,82 pmol/l (0-83,6 pmol/l; Standardabweichung 9,54 pmol/l; n = 402). Im Bereich des in der Literatur beschriebenen Referenzbereichs für Nüchtern-Proinsulin-Konzentrationen

4. Ergebnisse

von < 11 pmol/l liegen 66,2 % der Fälle ($n = 266$), während 33,8 % ($n = 136$) der Fälle über 11 pmol/l lagen. Es zeigte sich, dass bei Aufteilung der diabetischen Probanden nach Geschlecht männliche Diabetiker (MW 10,71 pmol/l; SD 10,08 pmol/l; $n = 269$) signifikant ($p < 0,0001$) höhere Proinsulin-Konzentrationen im Vergleich zu weiblichen Teilnehmern (MW 8,00 pmol/l; SD 8,10 pmol/l; $n = 133$) aufwiesen. Typ 2- Diabetiker (MW 12,22 pmol/l; SD 9,09 pmol/l; $n = 284$), bei denen die Proinsulin-Sekretion noch intakt ist, zeigten signifikant ($p < 0,0001$) höhere Proinsulin-Konzentrationen als Typ 1-Diabetiker (MW 3,87 pmol/l; SD 8,75 pmol/l; $n = 97$), bei denen die endogene Sekretion weitestgehend eingestellt ist. Weiterhin besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der schon bekannten Länge der Diabeteserkrankung und der Proinsulinsekretion. Bei Diabetikern, die von Ihrer Krankheit erst vor Kurzem erfahren, ist die Proinsulinsekretion noch ausgeprägt, während bei Langzeit-Diabetikern Proinsulinkonzentrationen > 10 pmol/l nicht mehr auftreten (siehe Abbildung 29).



$n = 380$; $R = 0,295$; $R^2 = 0,097$

Abbildung 29: Proinsulin-Konzentrationen von Typ 1- und Typ 2-Diabetikern und männlichen und weiblichen Diabetikern im Vergleich und Korrelation zwischen Länge der bekannten Diabeteserkrankung und der Proinsulin-Konzentration [pmol/l]

4. Ergebnisse

Gruppe	Mittelwert [pmol/l]	Median [pmol/l]	Minimum [pmol/l]	Maximum [pmol/l]	n	SD [pmol/l]
Diabetiker ohne Medikation	8,38	6,75	0	51	140	7,63
Diabetiker Therapie mit Sulphonylharnstoffen	21,14	16,9	3,9	83,6	27	15,47
Diabetiker Therapie andere orale Antidiabetika	12,87	12,4	3,4	34,6	21	7,73
Diabetiker Therapie synthetische Insuline	7,4	3,65	< LoD	83,4	82	10,79
Diabetiker Therapie mit humanem Insulin	8,66	7,05	< LoD	32	74	9,76

Tabelle 28: Proinsulin-Konzentrationen der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive

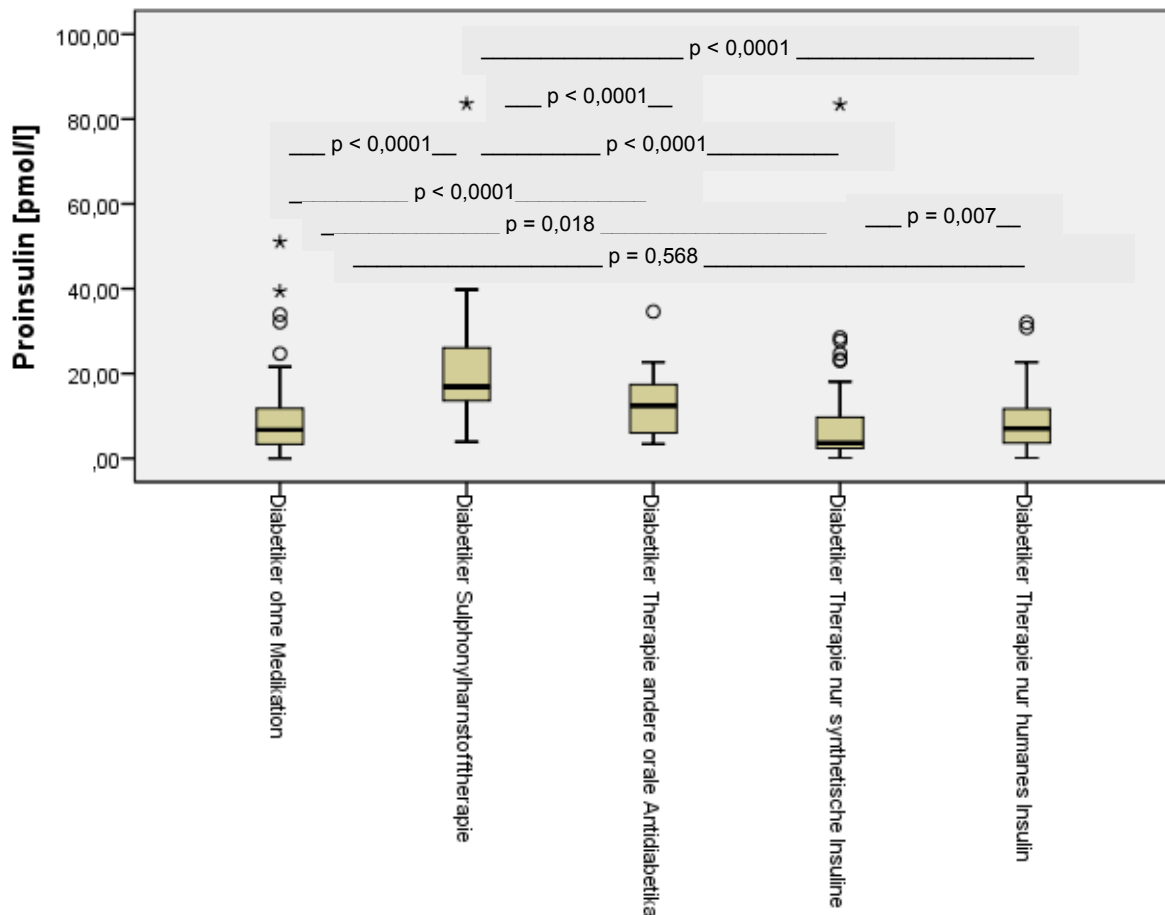


Abbildung 30: Proinsulin-Konzentrationen [pmol/l] von Diabetikern geordnet nach ihrer Therapie

Abbildung 30 zeigt die Proinsulin-Konzentrationen der nach Medikation eingeteilten Kollektive. Die Verteilung der Proinsulinkonzentrationen über die Stichproben war

4. Ergebnisse

nicht gleich ($p < 0,0001$). Sulfonylharnstoffe und andere orale Antidiabetika erhöhen aufgrund ihres Wirkmechanismus die Proinsulinkonzentrationen signifikant. Eine Therapie mit synthetischem oder humanem Insulin hat keinen Einfluss auf die mittleren Proinsulinkonzentrationen.

4.2.8 Methylglyoxal

Diabetiker (MW 81,1 ng/ml; Median 79,2 ng/ml; 19,9-192 ng/ml; $n = 98$) mit chronischer Hyperglykämie zeigten signifikant ($p < 0,001$) höhere Serumkonzentrationen in klinischen Proben als Nicht-Diabetiker (MW 10,5 ng/ml; Median 10,1 ng/ml; 6,0-14,5 ng/ml; $n = 98$). Abbildung 31 zeigt die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche von MG in Serumproben. Innerhalb der Diabetikergruppe gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,924$) zwischen Typ 1-Diabetikern (MW 77,2 ng/ml, 30,1-129 ng/ml; $n = 24$) und Typ 2-Diabetikern (MW 82,1 ng/ml, 19,9-192 ng/ml; $n = 74$).

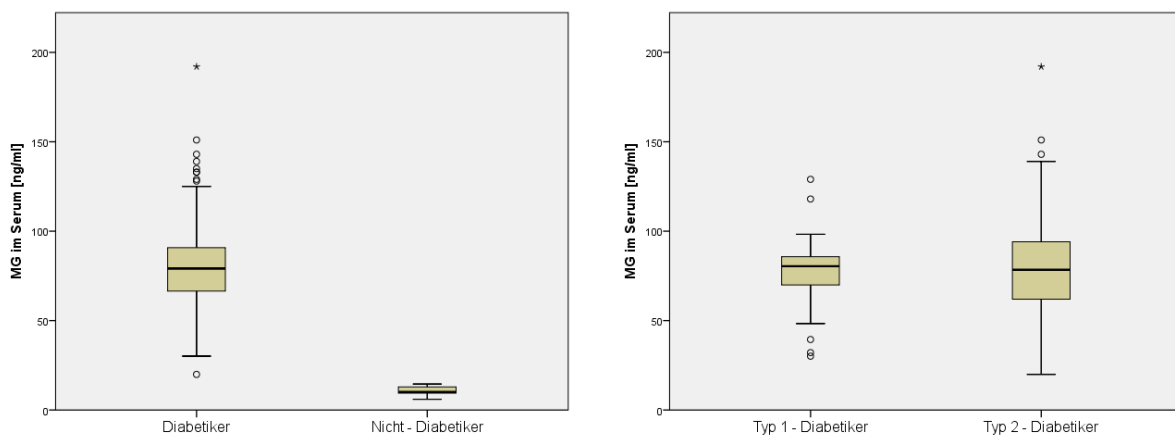


Abbildung 31: klinische MG-Serumkonzentrationen

4.2.9 Anhydroglucitol

Abbildung 32 zeigt in einem Boxplot die Konzentrationsbereiche von AG in Serumproben diabetischer Patienten (MW 5,74 $\mu\text{g/ml}$; $< \text{LoQ}$ -31,4 $\mu\text{g/ml}$, SD 6,08 $\mu\text{g/ml}$, $n = 434$) im Vergleich zum nicht-diabetischen Kollektiv (MW 23,3 $\mu\text{g/ml}$; 4,52-67,4 $\mu\text{g/ml}$, SD 7,39 $\mu\text{g/ml}$, $n = 263$), zu dem es einen signifikanten Unterschied gab ($p < 0,001$). Innerhalb des diabetischen Kollektivs gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,633$) zwischen männlichen (MW 5,72 $\mu\text{g/ml}$, $< \text{LoQ}$ -31,4 $\mu\text{g/ml}$, SD 6,14 $\mu\text{g/ml}$, $n = 291$) und weiblichen Diabetikern (MW 5,73 $\mu\text{g/ml}$, $< \text{LoQ}$ -29,0 $\mu\text{g/ml}$, SD 5,98 $\mu\text{g/ml}$, $n = 146$). Dagegen gibt es einen signifikanten

4. Ergebnisse

($p < 0,0001$) Unterschied zwischen Typ 1 Diabetikern (MW 3,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,07 $\mu\text{g/ml}$ -14,5 $\mu\text{g/ml}$; SD 2,70 $\mu\text{g/ml}$; $n = 103$) und Typ 2-Diabetikern (MW 6,26 $\mu\text{g/ml}$, 0,12 $\mu\text{g/ml}$ -31,4 $\mu\text{g/ml}$; $n = 308$). Ein Zusammenhang zwischen der Länge der Diabeteserkrankung und der AG - Konzentration besteht allerdings nicht (Abbildung 32).

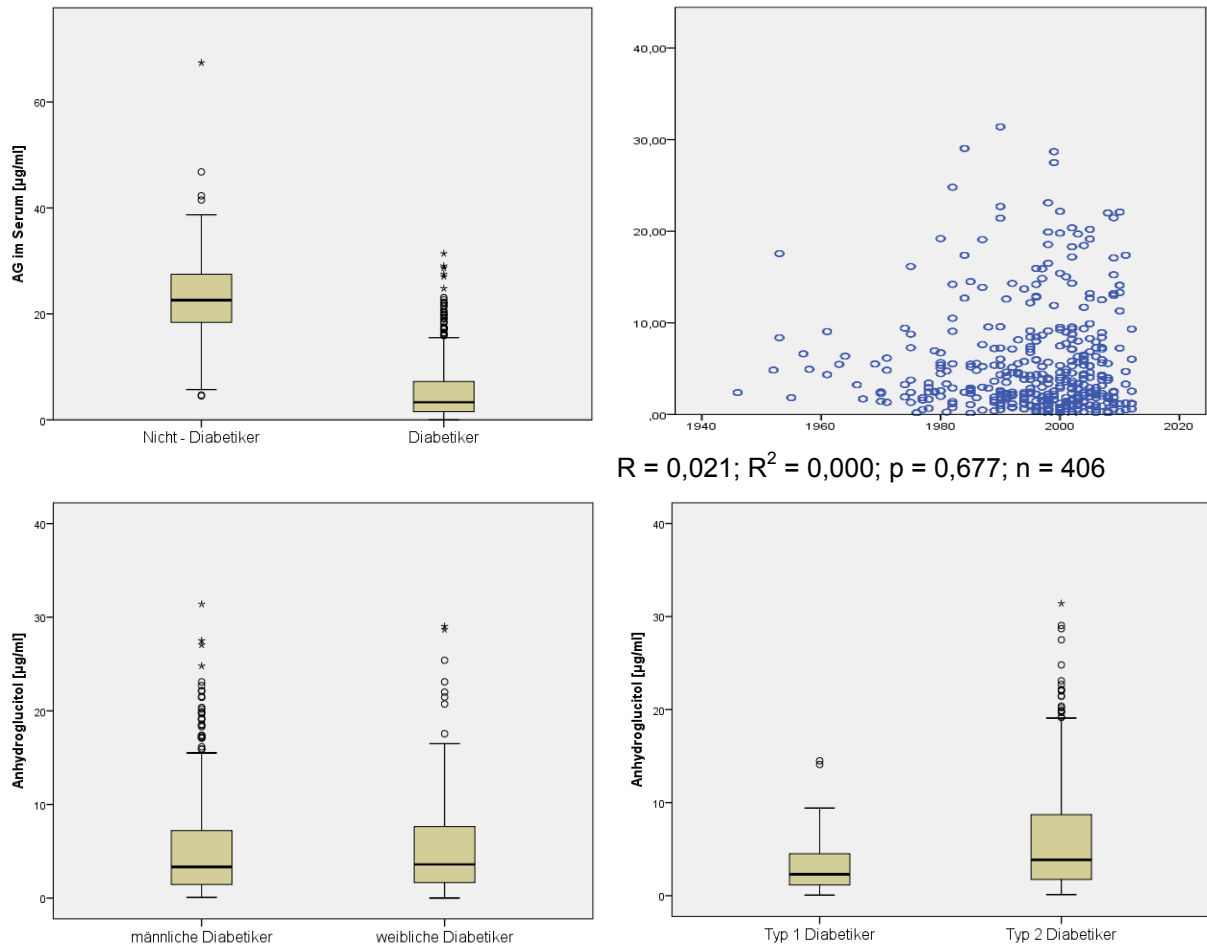


Abbildung 32: AG-Serumkonzentrationen von Nicht-Diabetikern und Diabetikern, männlichen und weiblichen Diabetikern und Typ 1- und Typ 2-Diabetikern im Vergleich und Zusammenhang zwischen bekannter Diabeteslänge und AG-Konzentration

4.2.10 Zusammenhang der Parameter

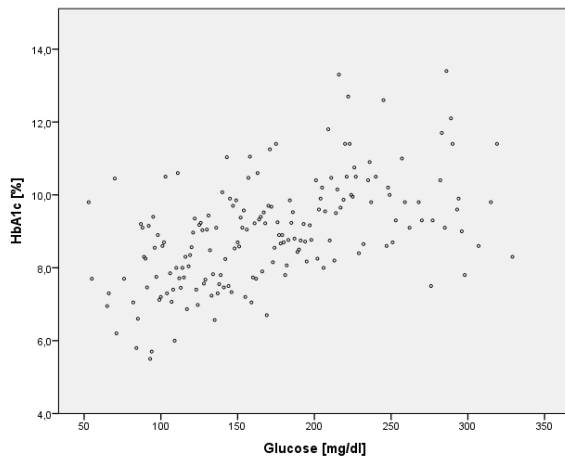
Inwiefern klinische Parameter miteinander korrelieren wurde mit der Gegenüberstellung dieser getestet, um auch für forensische Fälle geeignete Marker zu finden, die Rückschlüsse auf den glykämischen Status der Patienten zulassen. Die Glucosekonzentrationen wurden mit einigen Parametern korreliert (Abbildung 33): Zwischen HbA1c- und aktueller Glucosekonzentration besteht ein geringer

4. Ergebnisse

Zusammenhang, der sich noch am ehesten durch eine kubische Kurve beschreiben lässt. Noch schwächer korreliert die Fructosamin-Konzentration mit der aktuellen Glucosekonzentration. AG korrelierte schwach negativ mit Glucose, eine quadratische Kurve korrelierte besser. Alle drei Parameter sind eher Langzeitmarker, als dass sie die aktuelle Glucosekonzentration widerspiegeln. Untereinander korrelieren HbA1c und Fructosamin, HbA1c und AG negativ und Fructosamin und AG negativ. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 33 dargestellt.

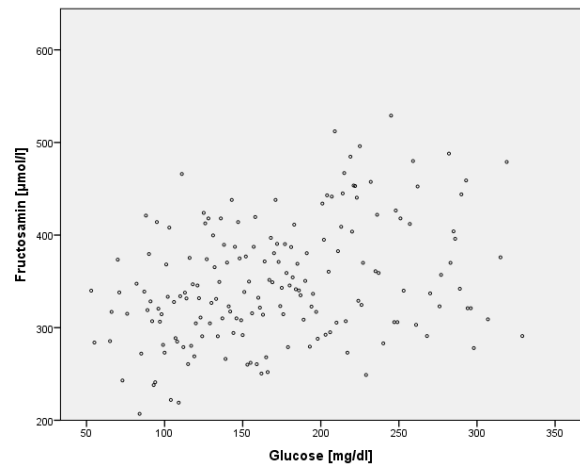
Mit der aktuellen Humaninsulin-Konzentration, der C-Peptid-Konzentration, dem I:C-Verhältnis und der Proinsulin-Konzentration korreliert die Glucose-Konzentration nicht. Zwischen der aktuellen Humaninsulin-Konzentration und der C-Peptid-Konzentration besteht über das gesamte Kollektiv ebensowenig ein Zusammenhang wie zwischen Humaninsulin- und Proinsulin-Konzentration. Das Verhältnis I:C korreliert ebenso nicht mit der Proinsulin-Konzentration. In Abbildung 34 wird aber deutlich, dass bei I:C-Verhältnissen > 5 , wie sie nach der Injektion von humanem Insulin vorkommen, Proinsulin-Konzentrationen stets unter 5 pmol/l liegen und somit auch die Proinsulin-Konzentration ein Indiz für eine Injektion mit humanem Insulin sein kann. Die Proinsulinkonzentration korreliert signifikant mit der C-Peptid-Konzentration (Abbildung 34).

4. Ergebnisse

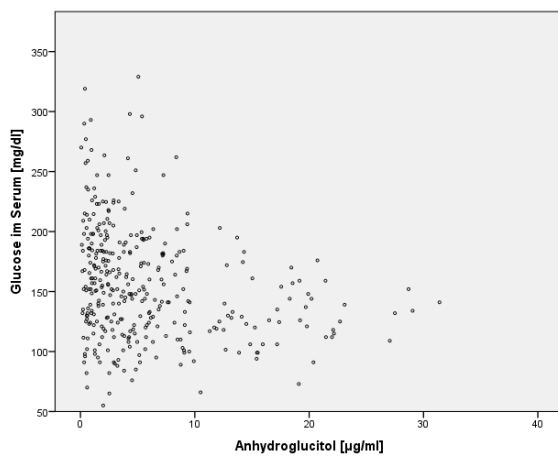


Linear: $R = 0,341$; $R^2 = 0,116$; $p < 0,0001$

Kubisch: $R^2 = 0,127$; $p < 0,0001$; $n = 445$

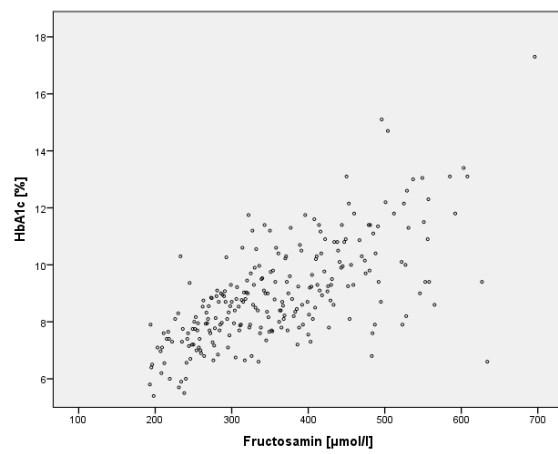


$R = 0,205$; $R^2 = 0,040$; $p < 0,0001$; $n = 448$

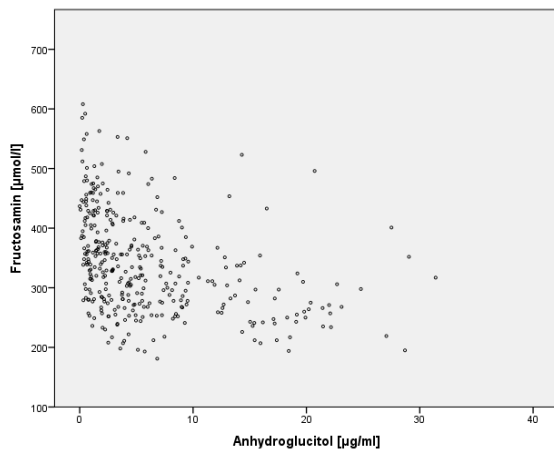


Linear: $R = -0,250$; $R^2 = 0,060$; $p < 0,0001$

Quadratisch: $R^2 = 0,070$; $p < 0,0001$; $n = 410$

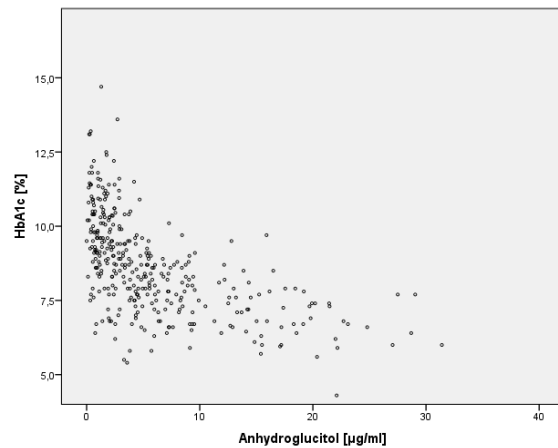


$R = 0,566$; $R^2 = 0,319$; $p < 0,0001$; $n = 467$



Linear: $R = -0,541$; $R^2 = 0,293$; $p < 0,0001$

Kubisch: $R^2 = 0,358$; $p < 0,0001$; $n = 427$

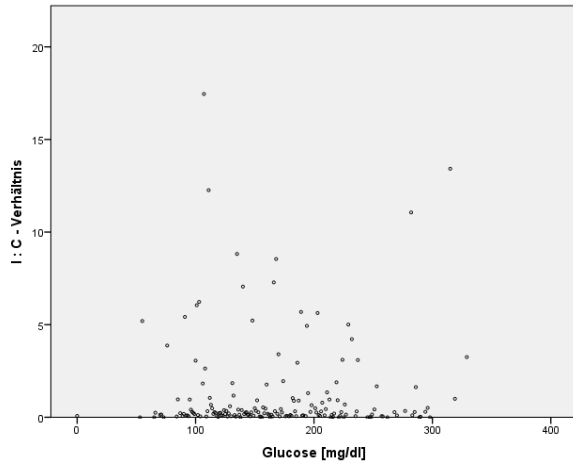


Linear: $R = -0,351$; $R^2 = 0,121$; $p < 0,0001$

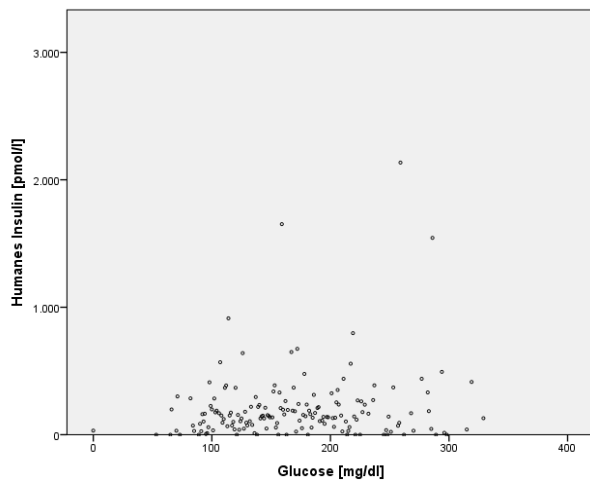
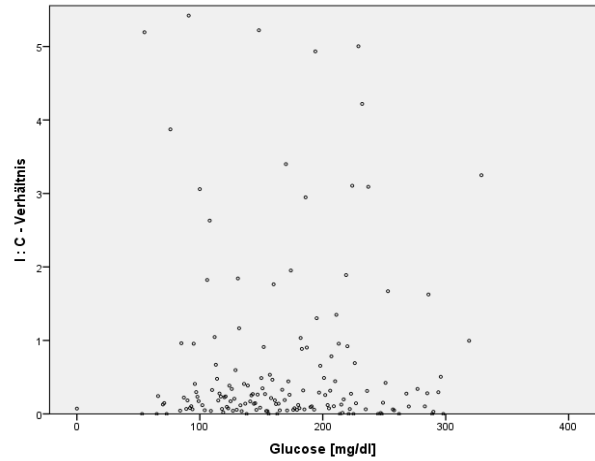
Kubisch: $R^2 = 0,159$; $p < 0,0001$; $n = 429$

Abbildung 33: Korrelation der Glucosekonzentration mit den Langzeitmarkern HbA1c, Fructosamin und AG und Korrelationen dieser untereinander

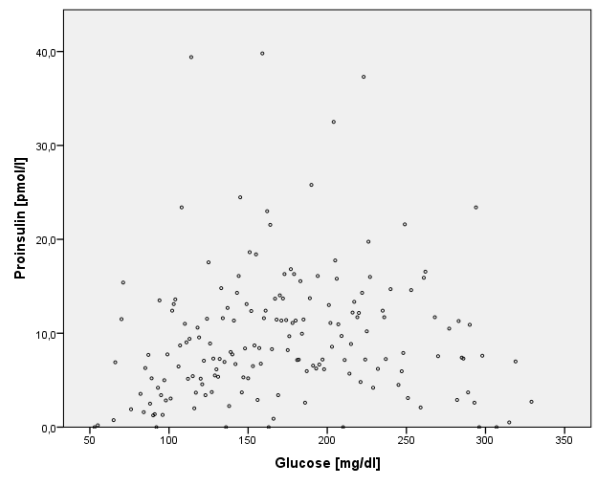
4. Ergebnisse



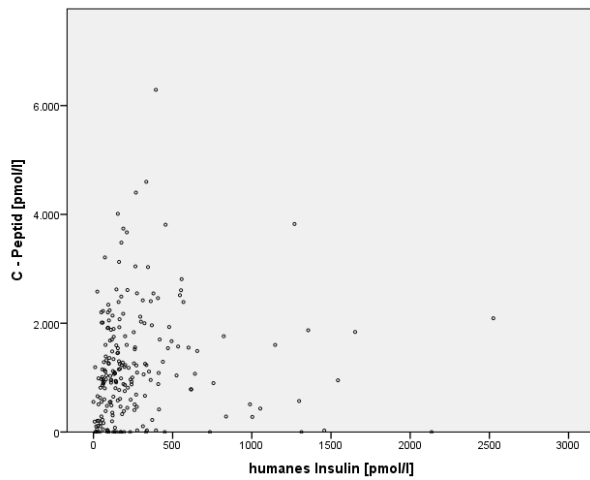
$R = 0,077$; $R^2 = 0,006$; $p = 0,119$; $n = 408$



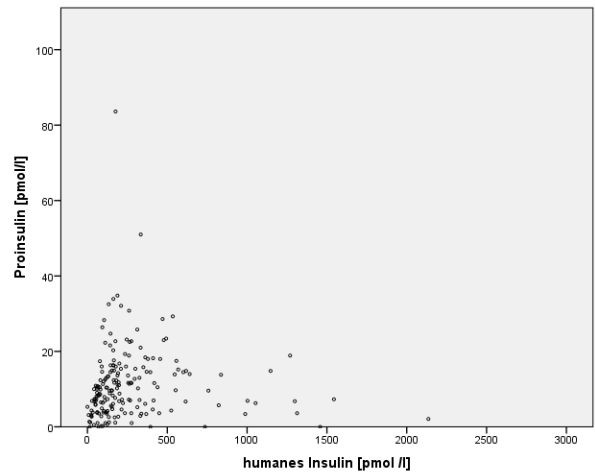
$R = 0,040$; $R^2 = 0,002$; $p = 0,405$; $n = 442$



$R = 0,118$; $R^2 = 0,014$; $p = 0,018$; $n = 393$

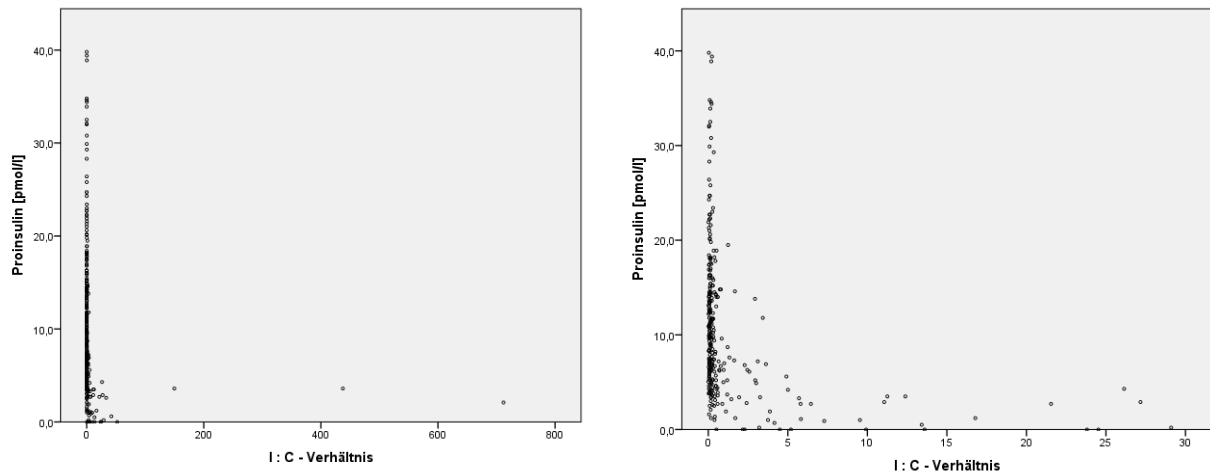


$R = 0,032$; $R^2 = 0,001$; $p = 0,549$; $n = 343$

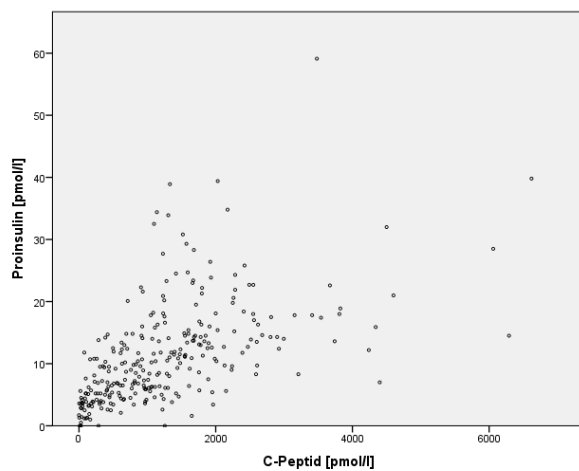


$R = 0,019$; $R^2 = 0,001$; $p = 0,743$; $n = 292$

4. Ergebnisse



$R = 0,085$; $R^2 = 0,007$; $p = 0,109$; $n = 356$



Linear: $R = 0,614$; $R^2 = 0,375$; $p < 0,0001$;

Kubisch: $R^2 = 0,450$; $p < 0,0001$; $n = 394$

Abbildung 34: Korrelation von Humaninsulin-, C-Pepid-, Proinsulinkonzentration und I : C-Verhältnis mit der Glucosekonzentration und untereinander

4.3 Forensische Proben

4.3.1 Glucose und Laktat

Glucose wurde post mortem in der GKF (MW 35,1 mg/dl; < LoQ-1053 mg/dl; SD 143 mg/dl; $n = 134$), in der CSF (MW 54,3 mg/dl; < LoQ-676 mg/dl; SD 131 mg/dl; $n = 76$) und im Urin (MW 361 mg/dl; < LoQ-4202 mg/dl; SD 1019 mg/dl; $n = 22$) bestimmt. Die Konzentrationen in den drei Matrices unterschieden sich signifikant ($p < 0,0001$). Abbildung 35 zeigt Boxplots. Nicht-Diabetiker (MW 11,4 mg/dl; < LoQ-201 mg/dl; SD 30,5 mg/dl; $n = 99$) und Diabetiker (MW 118 mg/dl; < LoQ-1053 mg/dl; SD 296 mg/dl; $n = 28$) zeigten keine signifikanten

4. Ergebnisse

Unterschiede ($p = 0,399$) in der Glucosekonzentration im Glaskörper. Im CSF zeigte sich dasselbe Bild bei Vergleich von Nicht-Diabetikern (MW 14,9 mg/dl; 0-82,6 mg/dl; SD 20,8 mg/dl; $n = 42$) und Diabetikern (MW 116 mg/dl; 0-176 mg/dl; SD 202 mg/dl; $n = 27$) ($p = 0,066$; Abbildung 35).

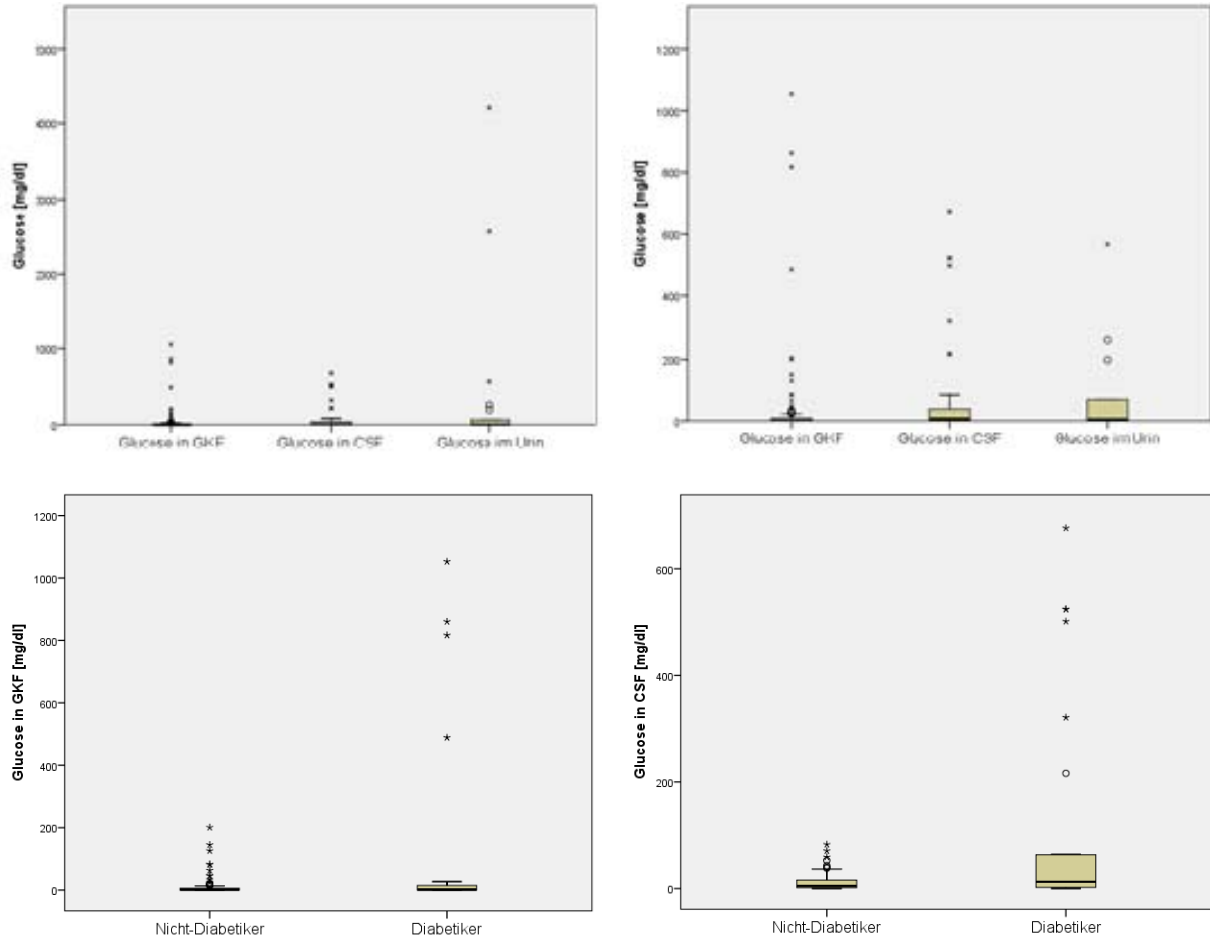


Abbildung 35: Glucosekonzentrationen post mortem in GKF, CSF und Urin (rechts kleinerer Maßstab) und Vergleich der Glucosekonzentrationen post mortem in GKF und CSF zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern

Laktat wurde post mortem in der GKF, in der CSF und im Urin (MW 109 mg/dl; 5,4-298 mg/dl; SD 85,1 mg/dl; $n = 21$) bestimmt. Die Laktatkonzentrationen in GKF (MW 284 mg/dl; 0,2-582 mg/dl; SD 98,2 mg/dl; $n = 134$) und CSF (MW 288 mg/dl; 5-504 mg/dl; SD 107 mg/dl; $n = 76$) unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,899$). Abbildung 36 zeigt Boxplots. Laktatkonzentrationen in der GKF unterschieden sich signifikant ($p = 0,002$) zwischen Nicht-Diabetikern (MW 270 mg/dl ; 0,2-462 mg/dl; SD 95,5 mg/dl; $n = 99$) und Diabetikern (MW 331 mg/dl ; 8-592 mg/dl; SD 105 mg/dl; $n = 28$). In der CSF zeigte sich dieser Unterschied ($p = 0,195$) zwischen Nicht-Diabetikern (MW 277 mg/dl ; 59-504 mg/dl; SD 104 mg/dl; $n = 42$) und Diabetikern

4. Ergebnisse

(MW 312 mg/dl ; 5-495 mg/dl; SD 120 mg/dl; n = 27) nicht. Abbildung 36 macht dies deutlich.

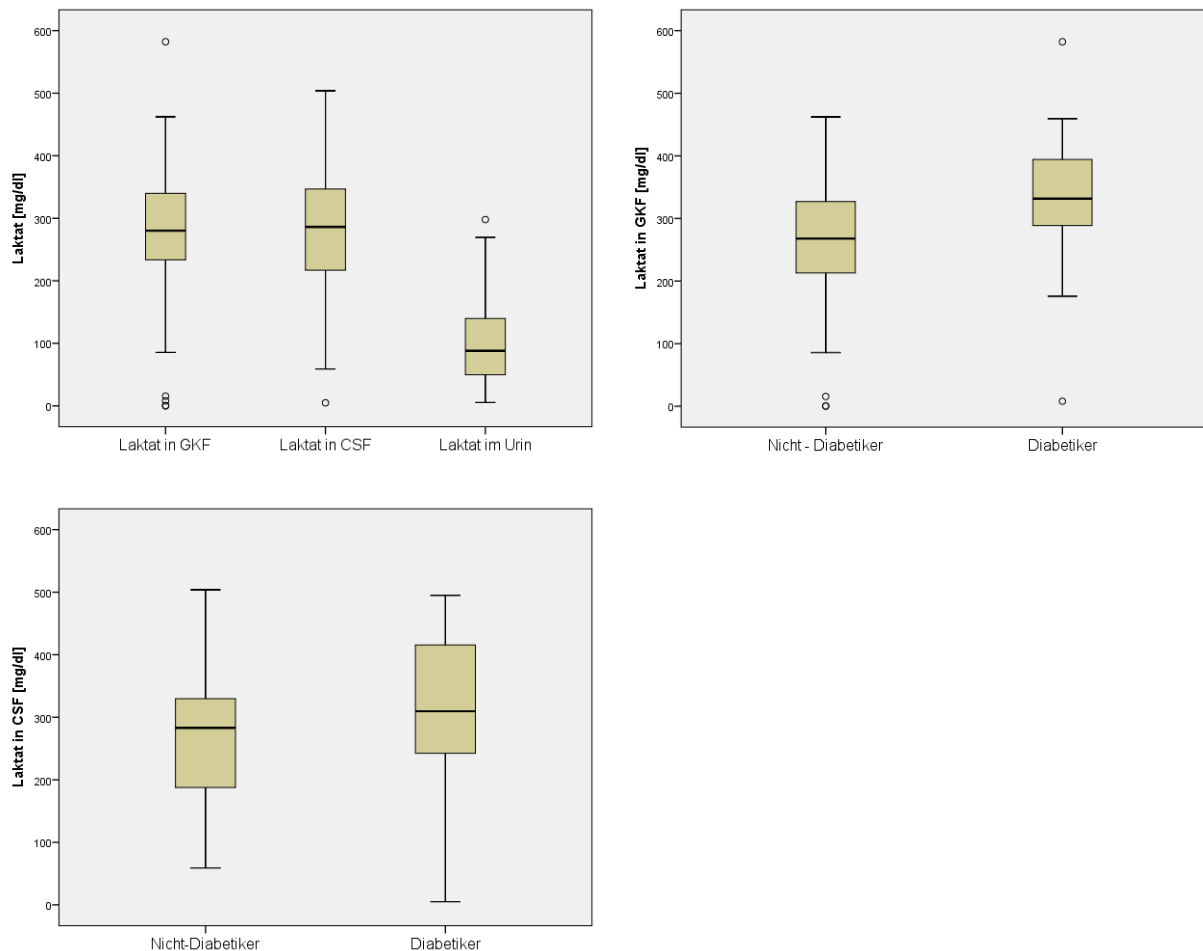


Abbildung 36: Laktatkonzentrationen post mortem in GKF, CSF und Urin

4.3.2 Summenformel nach Traub

Die Summenformel nach Traub in der GKF und der CSF wurde berechnet, indem die Glucosekonzentration in mg/dl und die Hälfte der Laktatkonzentration in mg/dl addiert wurden. Die Summenformeln in GKF (MW 177 mg/dl, 0,1-1210 mg/dl, SD 160 mg/dl; n = 134) und CSF (MW 198 mg/dl, 5,7-801 mg/dl, SD 154 mg/dl; n = 76) unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,250$). Summenformeln in der GKF unterschieden sich signifikant ($p = 0,003$) zwischen Nicht-Diabetikern (MW 147 mg/dl; 0,1-344 mg/dl; SD 57,7 mg/dl; n = 99) und Diabetikern (MW 284 mg/dl; 4,0-1210 mg/dl; SD 312 mg/dl; n = 28). Ebenso unterschieden sich die Summenformeln in der CSF signifikant ($p = 0,046$) zwischen Nicht-Diabetikern (MW 153 mg/dl; 30,1-355 mg/dl; SD 61,6 mg/dl; n = 42) und Diabetikern (MW 272 mg/dl; 5,7-801 mg/dl; SD 228 mg/dl; n = 27). Abbildung 37 zeigt in Boxplots

4. Ergebnisse

Vergleiche der Summenformeln nach Traub zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern in GKF und CSF.

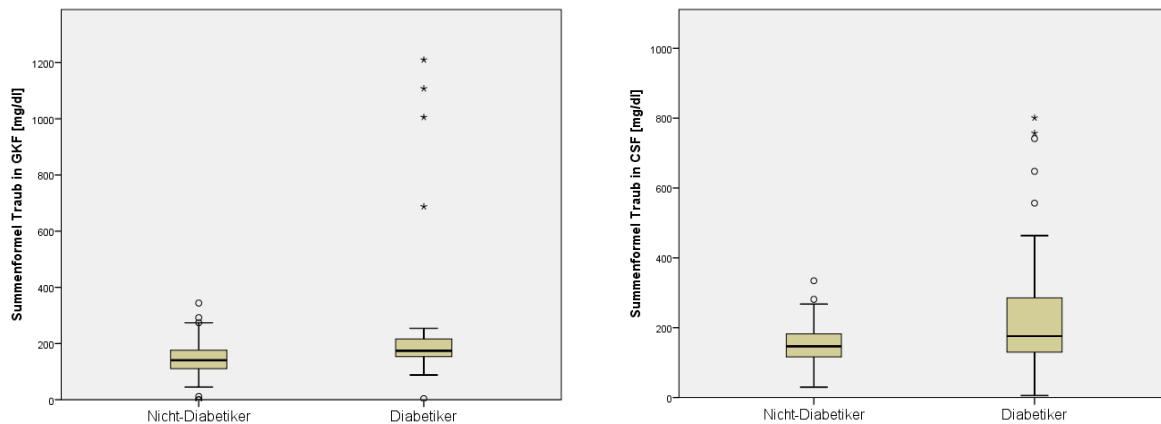


Abbildung 37: Summenformeln nach Traub in GKF und CSF; Vergleich von Nicht-Diabetikern und Diabetikern

4.3.3 HbA1c

Von 115 Verstorbenen wurde der HbA1c im FVB bestimmt, die Konzentrationen lagen im Mittel bei 49,8 mmol/l (MW; entspricht 6,69 %; 24,6-132,2 mmol/l entspricht 4,40-14,3 %; SD 18,9 mmol/l). Diabetiker (MW 59,9 mmol/mol entspricht 7,63 %; 27,2-108,9 mmol/mol entspricht 4,64-12,11 %; SD 23,0 mmol/mol; n = 24) zeigten signifikant ($p = 0,006$) höhere HbA1c-Konzentrationen post mortem als Nicht-Diabetiker (MW 47,8 mmol/mol entspricht 6,52 %; 24,6-132,2 mmol/mol entspricht 4,40-14,3 %; SD 17,1 mmol/mol; n = 85). Abbildung 38 zeigt einen Boxplot. Einige extrem hohe HbA1c-Konzentrationen von Verstorbenen, in deren Unterlagen keine Diabeteserkrankung festgehalten war, lassen darauf schließen, dass hier ein unbekannter oder nicht dokumentierter Diabetes mellitus vorlag.

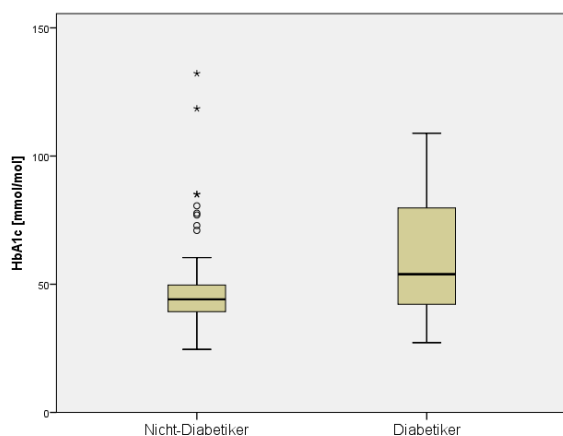


Abbildung 38: HbA1c-Konzentrationen post mortem

4. Ergebnisse

4.3.4 Fructosamin

Fructosamin wurde post mortem im gefällten Blut (MW 92,3 $\mu\text{mol/l}$; 11,6-513 $\mu\text{mol/l}$; SD 70,5 $\mu\text{mol/l}$; n = 104), in der GKF (MW 48,1 $\mu\text{mol/l}$; < LoQ-448 $\mu\text{mol/l}$; SD 102 $\mu\text{mol/l}$; n = 40) und in der CSF (MW 109 $\mu\text{mol/l}$; 11,3-383 $\mu\text{mol/l}$; SD 99,8 $\mu\text{mol/l}$; n = 21) gemessen. Fructosamin-Konzentrationen in den 3 Matrices sind Abbildung 39 aufgeführt. Die Konzentrationen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,0001$). Nur in der Matrix Serum konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,005$) zwischen Diabetikern (MW 138 $\mu\text{mol/l}$; 12,3-513 $\mu\text{mol/l}$; SD 113 $\mu\text{mol/l}$; n = 19) und Nicht-Diabetikern (MW 78,4 $\mu\text{mol/l}$; 11,6-286 $\mu\text{mol/l}$; SD 49,7 $\mu\text{mol/l}$; n = 81) beobachtet werden. In der GKF ($p = 0,599$) und in der CSF ($p = 0,252$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern. Werte $> 100 \mu\text{mol/l}$ in der GKF und $> 150 \mu\text{mol/l}$ in der CSF wurden allerdings nur bei bekannten Diabetikern ermittelt (Abbildung 39).

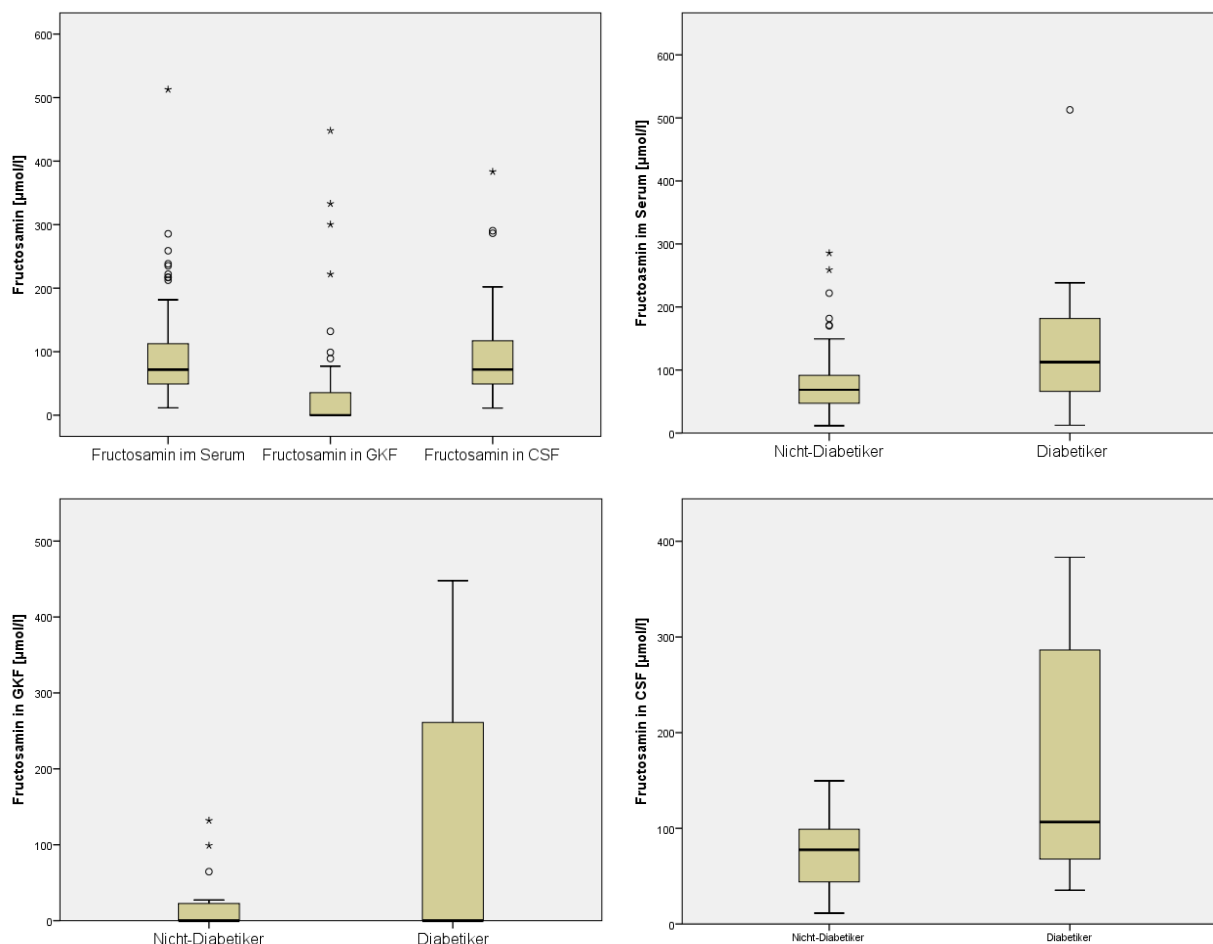


Abbildung 39: Fructosamin-Konzentrationen post mortem in Serum, GKF und CSF und Vergleich Nicht-Diabetiker / Diabetiker in den drei Matrices

4. Ergebnisse

4.3.5 Methylglyoxal

No.	Alter	Geschlecht	Todesursache	Tage zwischen Tod und Obduktion	Matrix	Tage nach Obduktion	MG [ng/ml]	Summenformel [mg/dl] (Mittelwert aus 5 Messungen)				
1	48	f	Lungenembolie	2	FVB	0	321					
						1	1210					
						2	1100					
						5	1250					
						8	1300					
						12	1305					
										GKF		268
				CSF		479						
2	49	m	Fulminante Lungenembolie	6	FVB	0	148					
						1	555					
						2	820					
						5	1360					
						10	1170					
										GKF		166
										CSF		227
3	56	m	Herztod mit Kardiomyopathie	2	FVB	0	218					
						1	348					
						2	605					
						5	1095					
						10	1045					
										GKF		127
										CSF		120
4	33	m	Multidrogen intoxication	2	FVB	0	412					
						1	590					
						4	1090					
						8	1085					
										GKF		119
										CSF		124
5	40	m	Kohlenmonoxid intoxication	3	FVB	0	384					
						4	915					
						8	1050					
						14	1080					
										GKF		124
				CSF		241						

Tabelle 29: Veränderungen der MG-Konzentrationen [ng/ml] in den Tagen nach der Obduktion (m:männlich, f:weiblich)

4. Ergebnisse

Das post mortem Intervall (PMI) der Nichtdiabetiker betrug 3,59 Tage (MW, 0-8 Tage, Median 3 Tage, PMI von 20 Nicht-Diabetikern unbekannt). Von 54 der 98 Nicht-Diabetiker konnte GKF oder CSF gesammelt werden, die Summenformel nach Traub war < 450 mg/dl in der GKF. Weiterhin wurden 7 Fälle von Diabetikern im Status eines hyperglykämischen Komas mit einer Summenformel nach Traub > 450 mg/dl in der GKF betrachtet. Die PMI dieser Verstorbenen war 3,40 Tage (MW, 1-8 Tage, Median 3 Tage, PMI von 5 dieser Verstorbenen unbekannt). Die PMI der beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,2$).

Nach der Probennahme bei der Obduktion erhöhten sich die MG Konzentrationen enorm. FVB, GKF und CSF von 5 Obduktionsfällen ohne eine Diabetes-Vorerkrankung wurden entnommen (Tabelle 29). Die gemessenen MG-Konzentrationen stiegen mit dem post mortem Intervall, bis sie nach ca. 5 Tagen post mortem ein Plateau erreichten. Die gemessenen Konzentrationen sind dann signifikant ($p < 0,0001$) erhöht im Vergleich zu lebenden Personen und betragen > 1000 ng/ml. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen der Todesursache „Hyperglykämisches Koma“ und anderen Todesursachen ($p = 0.001$). Verstorbene mit der Todesursache „diabetisches Koma“ zeigten MG Konzentrationen von 4785 ng/ml (MW; Median 2595 ng/ml; 754-12500 ng/ml; $n = 7$), andere Todesursachen zeigten MG Konzentrationen von 2383 ng/ml (MW, Median 1380 ng/ml; 104-35200 ng/ml, $n = 84$). Abbildung 39 zeigt die mittleren Konzentrationen in einem Boxplot.

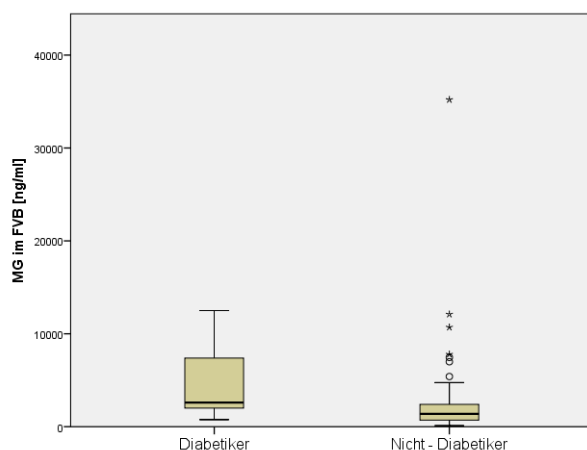


Abbildung 40: Vergleich der MG-Konzentrationen post mortem

4. Ergebnisse

4.3.6 Anhydroglucitol

In Toten waren die mittleren AG-Konzentrationen im FVB signifikant ($p < 0,001$) höher bei Nicht-Diabetikern (MW 15,5 $\mu\text{g/ml}$; 3,21-40,8 $\mu\text{g/ml}$; SD 8,7 $\mu\text{g/ml}$; $n = 88$) als bei Diabetikern (MW 4,74 $\mu\text{g/ml}$; $< \text{LoQ}$ -25,2 $\mu\text{g/ml}$; SD 5,4 $\mu\text{g/ml}$; $n = 71$). Abbildung 41 zeigt einen Boxplot. Bei 5 Fällen mit Todesursache „diabetisches Koma“ mit einer Summenformel nach Traub $> 450 \text{ mg/dl}$ in der GKF oder in der CSF wurde ebenfalls AG gemessen. Die mittleren Konzentrationen dieser durch diabetisches Koma Verstorbenen (MW 1,13 $\mu\text{g/ml}$; $< \text{LoQ}$ -3,15 $\mu\text{g/ml}$; SD 1,2 $\mu\text{g/ml}$; $n = 5$) waren signifikant niedriger ($p < 0,001$) als bei Nicht-Diabetikern. Die Konzentrationen unterscheiden sich aber nicht signifikant von diabetischen Verstorbenen mit einer Summenformel im Normbereich ($p = 0,09$).

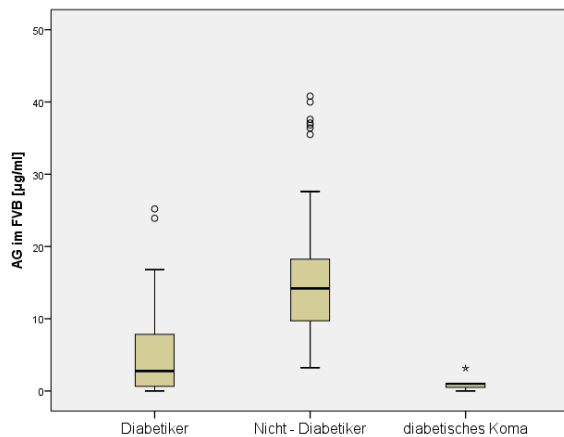


Abbildung 41: Vergleich der AG-Konzentrationen post mortem im FVB von Diabetikern, Nicht-Diabetikern und von Verstorbenen mit einer erhöhten Summenformel nach Traub

4.3.7 Humanes Insulin

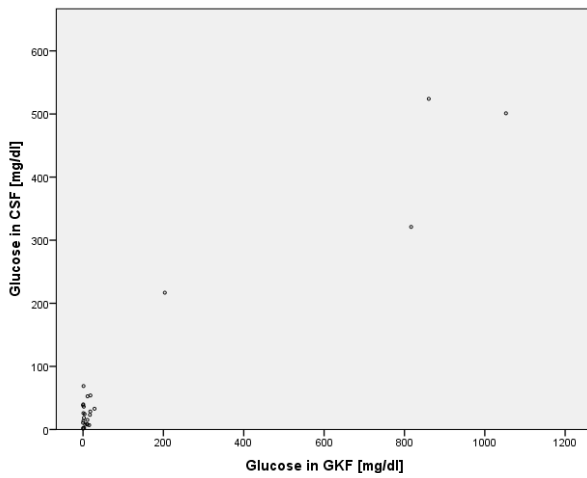
In forensischen Fällen konnte humanes Insulin bei Kontrollfällen weder in FVB ($n = 60$), noch in GKF ($n = 46$) und CSF ($n = 27$) nachgewiesen werden.

4.3.8 Zusammenhang der Parameter

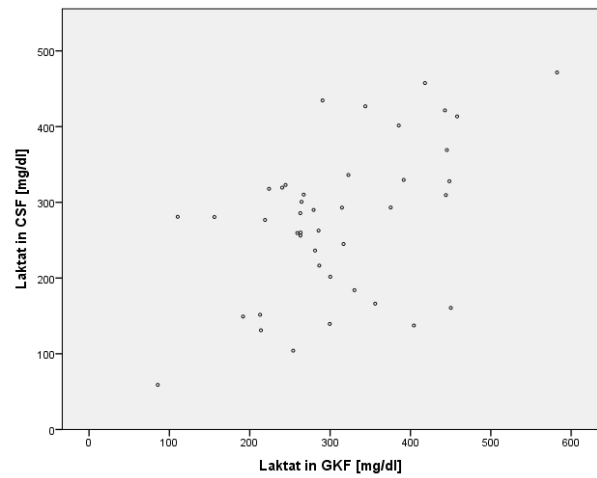
In Abbildung 42 sind jeweils Glucose- und Laktatkonzentrationen und Summenformeln nach Traub in GKF und CSF gegeneinander aufgetragen. Die Parameter korrelieren in den beiden Matrices signifikant miteinander. Ob die Glucosekonzentration im Urin ebenfalls eine Aussagekraft bezüglich einer ante mortem Hyperglykämie besitzt, wurde durch die Korrelation der

4. Ergebnisse

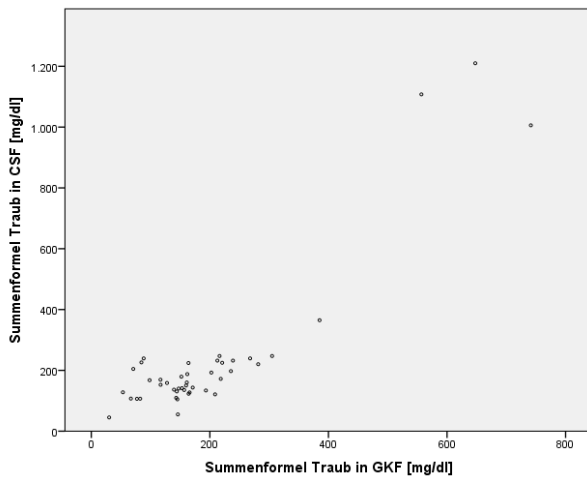
Glucosekonzentrationen im Urin mit den Summenformeln in GKF oder CSF erfasst (Abbildung 42).



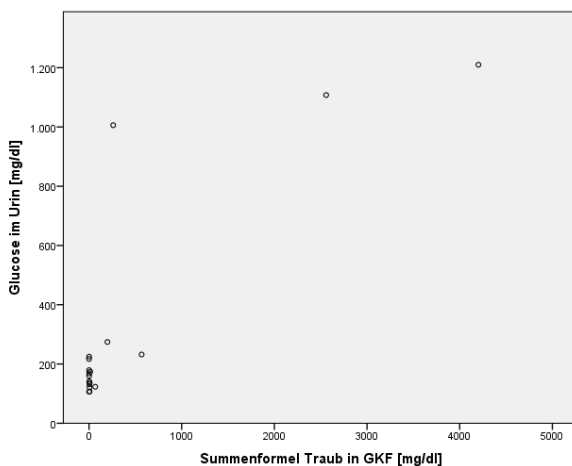
$R = 0,961$; $R^2 = 0,922$; $p < 0,0001$; $n = 46$



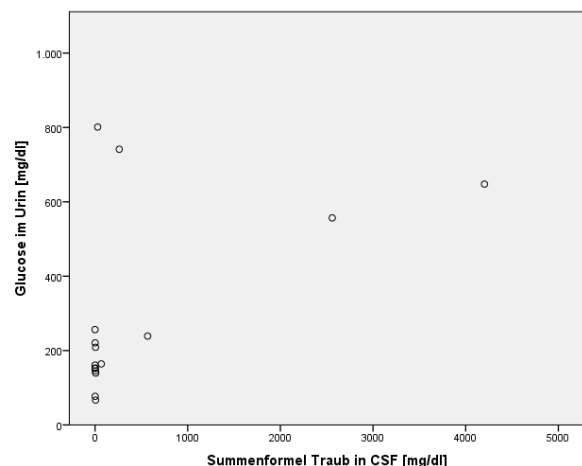
$R = 0,507$; $R^2 = 0,240$; $p < 0,0001$; $n = 46$



$R = 0,905$; $R^2 = 0,815$; $p < 0,0001$; $n = 46$



$R = 0,836$; $R^2 = 0,682$; $p < 0,0001$; $n = 20$

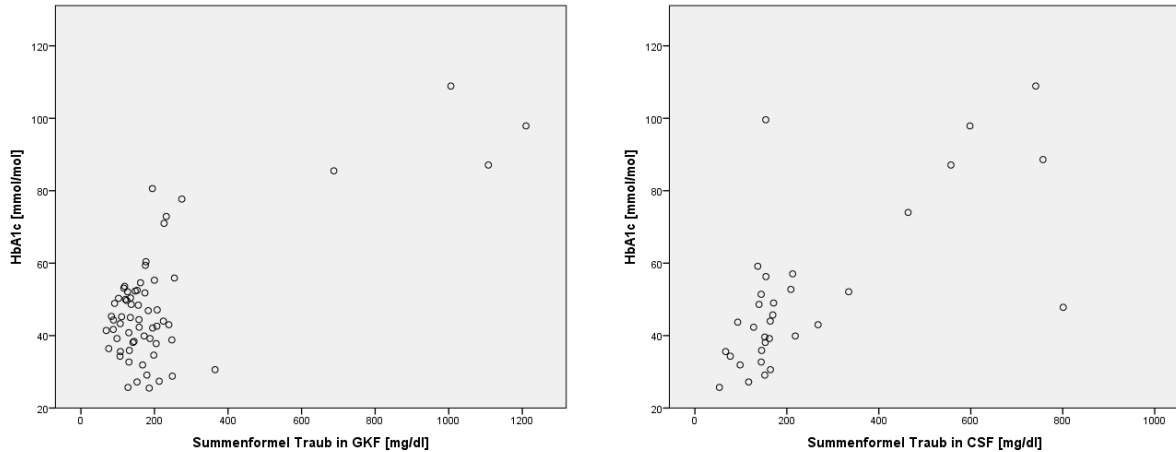


$R = 0,510$; $R^2 = 0,260$; $p = 0,036$; $n = 17$

Abbildung 42: Korrelation der Glucose- bzw. Laktatkonzentrationen und der Summenformeln in der GKF und der CSF und Korrelation der Glucosekonzentration im Urin mit der Summenformel nach Traub in der GKF und in der CSF

4. Ergebnisse

Die Glucosekonzentration im Urin korreliert mit der Summenformel in der GKF und in der CSF. Abbildung 43 zeigt die signifikanten Korrelationen der HbA1c-Konzentration post mortem mit den Summenformeln in GKF und CSF.

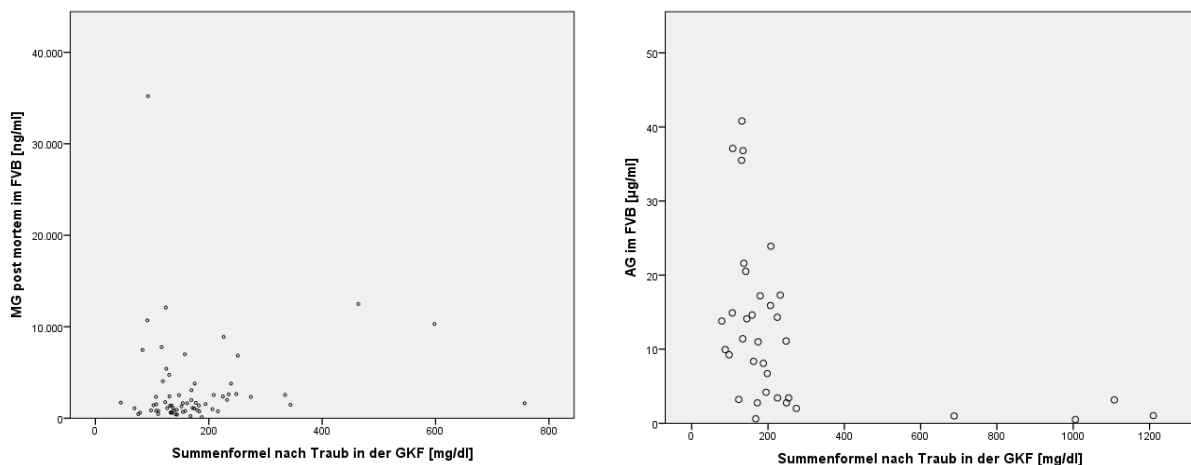


$R = 0,712$; $R^2 = 0,499$; $p < 0,0001$; $n = 63$

$R = 0,660$; $R^2 = 0,419$; $p < 0,0001$; $n = 36$

Abbildung 43: Korrelation der HbA1c-Konzentration post mortem mit der Summenformel nach Traub in der GKF und in der CSF

Abbildung 45 zeigt die Korrelation der Fructosamin-Konzentration in Serum, GKF und CSF post mortem mit der Summenformel in der GKF und der HbA1c-Konzentration. Zwischen der Summenformel nach Traub in der GKF und den MG-Femoralblutkonzentrationen ergab sich kein Zusammenhang, für die AG-Konzentrationen post mortem ein schwacher (Abbildung 44).

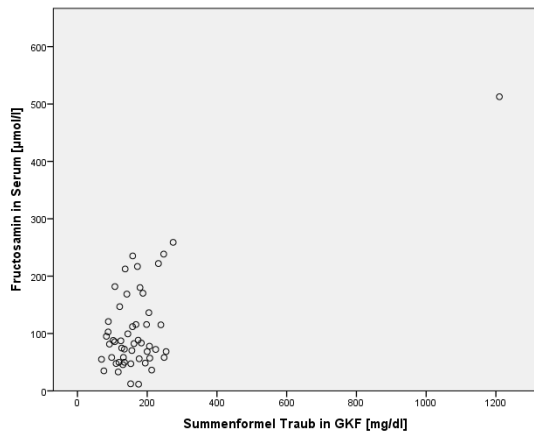


$R = 0,092$; $R^2 = 0,008$; $p = 0,439$; $n = 87$

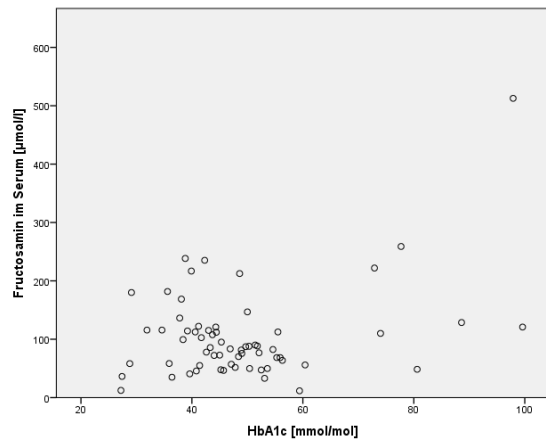
$R = -0,414$; $R^2 = 0,146$; $p = 0,014$; $n = 35$

Abbildung 44: Korrelation der Summenformel nach Traub in der GKF mit der MG-Konzentration und der AG-Konzentration post mortem im FVB

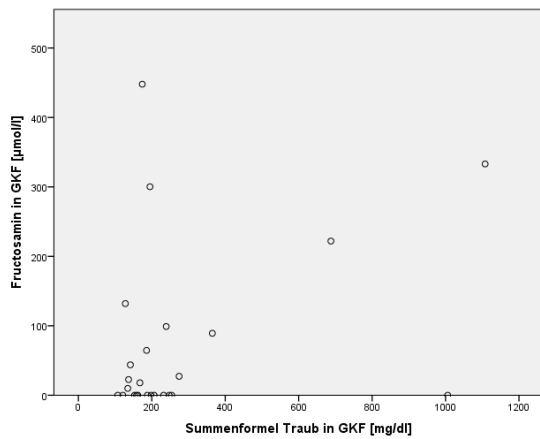
4. Ergebnisse



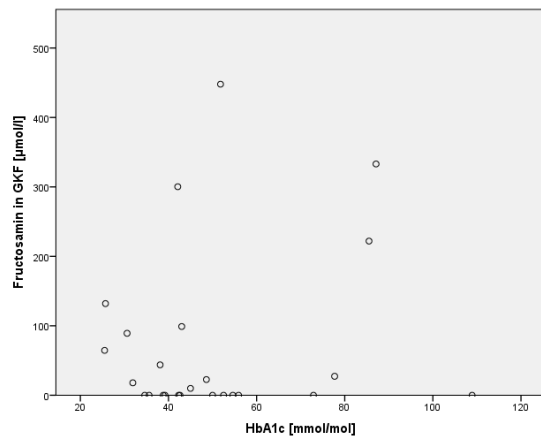
$R = 0,710$; $R^2 = 0,494$; $p < 0,0001$; $n = 52$



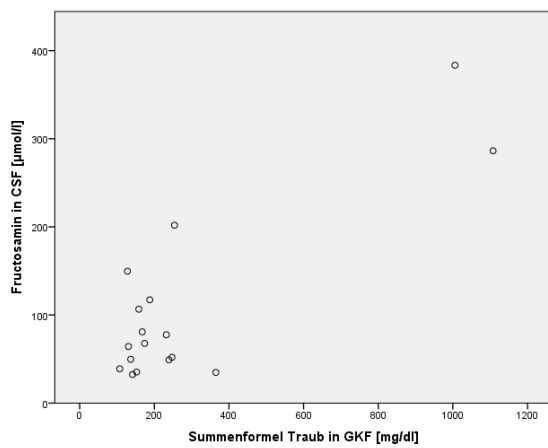
$R = 0,337$; $R^2 = 0,114$; $p = 0,006$; $n = 66$



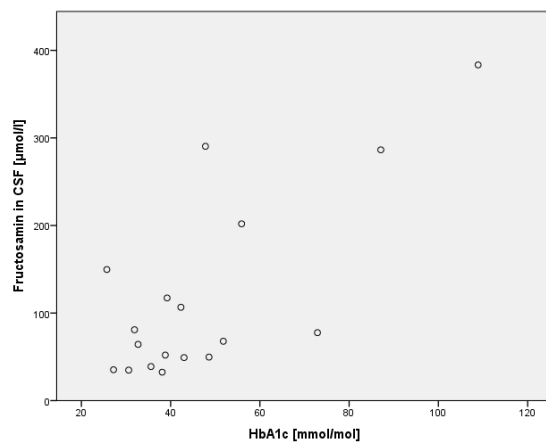
$R = 0,337$; $R^2 = 0,075$; $p = 0,099$; $n = 25$



$R = 0,171$; $R^2 = 0,013$; $p = 0,414$; $n = 25$



$R = 0,841$; $R^2 = 0,688$; $p < 0,0001$; $n = 17$



$R = 0,742$; $R^2 = 0,550$; $p < 0,0001$; $n = 18$

Abbildung 45: Korrelationen der Fructosamin-Konzentration in Serum, GKF und CSF post mortem mit der Summenformel in der GKF und dem HbA1c

5. Diskussion

5 Diskussion

5.1 Analytische Methodenentwicklung

5.1.1 Humanes und synthetische Insuline

Bisher basierten die meisten biologischen Methoden auf Liganden-Bindungsassays wie RIA oder ELISA [295]. Ein großes Problem bei diesen Methoden ist die Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Insulinanaloga und zu anderen Peptiden. Diese ist von der Wahl der spezifischen monoklonalen Antikörper abhängig und kann konzentrationsabhängig bis zu 50-100 % betragen [190]. Für die Bestimmung einzelner Insulinanaloga wurden Immunoassays beschrieben [296], die durch Benutzung von Subtraktions- oder Multiplikationsfaktoren basierend auf der bekannten Kreuzreaktivität die Konzentrationen ermitteln. Auch der in 4 beschriebene Vergleich von Immunoassay und chromatographisch-massenspektrometrischer Methodik zeigte massive Abweichungen für humanes Insulin. Für die Bewältigung der Probleme der Immunoassays wurde auf die LC/MS-Analytik zurückgegriffen. Die erhöhte Spezifität der Methodik und die breiteren dynamischen Bereiche erhöhen die Verlässlichkeit deutlich. Die Analytik von intakten Insulinen mittels LC-MS gestaltet sich aber aufgrund unspezifischer Bindung und schwacher Sensitivität, Löslichkeit und Fragmentierung schwer. Die beschriebene Methodik zur Bestimmung von humanem und synthetischen Insulinen konnte diese Probleme lösen.

Die Erhöhung von Selektivität und Wiederfindungsraten für Insulinanaloga in Serum stellt keine einfache Aufgabe dar. Die Peptide sind zwitterionisch und ihr Verhalten schwer vorherzusehen. Sie müssen allerdings von einer Vielzahl anderer, potentiell isobarer Peptide getrennt werden. Die sensitivste der bisher beschriebenen Methoden beschreibt eine Urinaufarbeitung mittels einer mehrstündigen vierstufigen SPE gefolgt von einem immunoaffinitätschromatographischen Aufreinigungsschritt und einem weiteren SPE-Schritt [297]. Es konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Proteinfällung eine nicht ausreichende Selektivität zur Folge hat [298]. Mittels der in 3.3.4.4 beschriebenen Probenaufarbeitung wurde deutlich, dass die Immunoaffinitätsaufreinigung mit magnetischen beads eine sehr selektive Aufarbeitungstechnik darstellt. Die Vorteile gegenüber einem Anti-Insulin

5. Diskussion

Immunoaffinitätsgel [298] sind die leichtere und schnellere Handhabung der bead-Lösung. Die Immunoglobuline an der Oberfläche der magnetischen beads tendieren jedoch dazu, nicht nur die Insulin-Antikörper, sondern auch unspezifisch weitere Proteine zu binden. Zwei Möglichkeiten, dieses Problem zu umgehen, konnten in Betracht gezogen werden: Ho et al. [299] banden die beads an die Antikörper, bevor die Probe zugegeben wurde. Dies dauert zwei Tage, überschüssige Tosylgruppen werden dadurch blockiert und die Bindung an andere Proteine wird reduziert. Die andere Möglichkeit war die Einführung eines Fällungsschrittes vor der Immunoaffinitätsaufreinigung. Diese gängige Praxis in der forensischen Toxikologie zur Probenvorbereitung ist für viele Peptide mit erheblichen Verlusten verbunden (siehe C-Peptid), für die Insuline ist ein Fällungsschritt allerdings möglich. Humanes Insulin und seine Analoga werden weder mit Acetonitril noch mit Methanol gefällt. Aufgrund seiner milderen Fällungseigenschaften wurde Acetonitril als Fällungsmittel gewählt. Die Probenvorbereitung für Urinproben erfordert keinen Fällungsschritt, da weniger Proteine in Urinproben die Selektivität der Probenvorbereitung und die chromatographische massenspektrometrische Detektion nicht beeinflussen [297]. Eine weitere selektive Möglichkeit, diesen Fällungsschritt zu umgehen, ist die Benutzung von 96-well Mikroelutionsplatten [297], um die Insuline vor der massenspektrometrischen Bestimmung zu konzentrieren. Diese Platten (in diesem Fall polymere Reversed phase-SPE) sind charakterisiert durch eine hohe Ladungsfähigkeit und geringe Elutionsvolumina, die eine bis zu 15fache Konzentrierung erlauben.

Die Wiederfindungsraten mit der Immunoaffinitätsaufreinigung mittels der magnetischen beads waren mit 33,2-51,7 % ausreichend. Die Inkubationszeit hatte nach 1 h keinen Einfluss auf die Peakflächen der Insuline und die Wiederfindung der Insuline konnte nicht mehr erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität zu erhöhen, ist die Trennung der Disulfidbrücken der Insuline vor der Analyse. Die meisten Methoden bestimmen die intakten Insuline, andere benötigen hingegen die Reduktion der Disulfidbrücken, um A- und B- Kette separat zu vermessen. Dazu werden die Proben in 10 mM TRIS Base bei ungefähr pH 9-9,5 verdünnt. So konnte das Untergrundrauschen verringert und die Wiederfindungsrate auf bis zu 95 % (für Insulin glargin) erhöht werden [296]. Diese Trennung der Peptidketten war nach der selektiven Aufarbeitung mittels magnetischer beads mit der beschriebenen Methode nicht mehr nötig. Um die erforderliche Sensitivität im Bereich von $< 5 \mu\text{U/ml}$ zu

5. Diskussion

erreichen, musste auf mindestens 2 Milliliter Serum zurückgegriffen werden. Auch Thevis et al. [296] benötigten mindestens 4 ml Serum für die sensitive Detektion der Analyten in Serum. Die Probensammlung spielt eine wichtige Rolle bei dieser Aufreinigung. Falls die Proben nicht in Serumröhrchen gesammelt werden, müssen härtere Fällungsbedingungen angewendet werden und Aceton dient als Fällungsmittel. Um die Adsorption der Insuline an aktive Glasoberflächen zu minimieren, ging die Aufarbeitung in LoBind Protein Gefäßen vorstatten.

Ein weiteres Problem stellt die Löslichkeit der Insuline dar. Diese ist grundsätzlich im Sauren besser, sodass Essigsäure zum Wiederaufnehmen genommen und Essigsäure und Trifluoressigsäure in das Laufmittel mitaufgenommen wurden, was auch die Wiederfindungsrate erhöhte. Die Zeit für die chromatographische Trennung einer Probe konnte von 40 Minuten [297] auf 25 Minuten reduziert werden, kommt aber bei weitem nicht an die schnelle sechsminütige Trennung einer Ultra HPLC Methode heran [193, 296].

Auch die massenspektrometrische Detektion erweist sich als nicht einfach. Die Aminosäuresequenzen der sechs Zielanalyten ähneln der des humanen Insulins sehr. Eine Unterscheidung ist über ihre unterschiedlichen Molekulargewichte und Produktionen möglich. Die meisten der Analyten zeigten die höchste Peakintensität beim fünffach protonierten Molekül als Precursor-Ion. Das Chromatogramm des fünffach geladenen IS Rinderinsulin zeigte interferierende Matrixpeaks, weshalb die Dissoziation des sechsfach geladenen Moleküls betrachtet wurde. Eine effiziente Fragmentierung erforderte Kollisionsenergien von 80 oder 90 eV, welche in kleinen m/z -Verhältnissen der Produktionen resultieren. Diese Produktionen wurden dafür herangezogen, Insuline mit derselben Molekülmasse zu unterscheiden. Die Sequenz des schnellwirksamen Insulinanalogon Humalog[®] unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren, die untereinander vertauscht wurden, von humanem Insulin. Eine chromatographische Trennung ist daher nicht möglich. Ihre Produktionenspektren unterscheiden sich nur in den beiden speziellen Produktionen m/z 226 für humanes Insulin und m/z 217 für Humalog (Abbildung 14), die aus dem C-Terminus der B-Ketten entstehen [179]. Humanes Insulin zeigt keine Fragmentierung zu m/z 217, sodass ein Fragment m/z 217 im Precursor-Chromatogramm von m/z 1162,5 (Retentionszeit: 7,07 min) einen klaren Hinweis auf eine Humalog[®]-Gabe gibt. Die Quantifizierung von Humalog ist trotz Anwesenheit von humanem Insulin über die Integration des Fragmentpeaks m/z 217 im Massenspektrum möglich. Im Falle einer

5. Diskussion

Humalog-Gabe ist dann allerdings keine Quantifizierung von humanem Insulin möglich, da Humalog in geringem Ausmaß ebenfalls zu m/z 226 fragmentiert wird. Durch die benötigten hohen Kollisionsenergien entstehen viele leichte Fragmente der Insuline, was bedeutet, dass eine Messung im MRM deutlich geringere Sensitivität als die Messung im EPI gezeigt hätte.

Für die Stabilitätsstudien wurde Serum sofort nach der Probensammlung von den roten Blutkörperchen getrennt. Das insulin-degrading enzyme (IDE), eine peroxisomale Protease [180], ist in vielen Geweben, auch in roten Blutkörperchen, aber besonders im Hämolysat, weit verbreitet [184]. Die Aktivität der IDE wird durch die von uns durchgeführten Lagerungsbedingungen bei -20°C erniedrigt, Insulin ist so stabil über einige Monate [181, 182]. Der enzymatische Abbau von Insulin kann ebenfalls verhindert werden, indem sogenannte IDE-Inhibitoren dem Blutröhrchen zugesetzt werden. Sulfhydryl-modifizierende Reagenzien werden in der Literatur als die effektivsten Inhibitoren beschrieben z.B. Diamid in einer Konzentration von ca. 1 mmol/l [200]. Die Stabilität von Insulin für mindestens zwei Wochen wurde von unserer Stabilitätsstudie bestätigt. Die Stabilität wurde auch durch den Zusatz von Diamid oder Phenylmethansulfonylsäurechlorid nicht positiv beeinflusst. Abwechselnde Einfrier- und Auftauzyklen hatten in früheren Studien keinen Effekt auf die gemessene Insulinkonzentration [98].

5.1.2 C-Peptid

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Immunoaffinitätsaufreinigung mit magnetischen beads auch für das C-Peptid eine selektive Aufarbeitungstechnik darstellt. Ein Fällungsschritt wie bei der Insulinanalytik (siehe 5.1.1) ist bei der Analytik des C-Peptids nicht möglich, das C-Peptid wird gefällt. Dies ist allerdings auch nicht vonnöten, eine selektive Aufarbeitung ist mit einem geeigneten Antikörper möglich. Um die Adsorption der Moleküle an aktive Glasoberflächen zu minimieren, ging die Aufarbeitung in LoBind Protein Gefäßen vonstatten. Leider konnten die gewünschten analytischen Grenzen nicht erreicht werden. Dies kann an der mangelnden Immunoreaktivität des monoklonalen Antikörpers gegen das C-Peptid, der mangelnden Immunogenität des kleinen Moleküls C-Peptid oder mangelhaft optimierten Parametern für die Immunoaffinitätsreinigung zusammenhängen. Es wird empfohlen, einige weitere kommerziell erhältliche Antikörper gegen das C-Peptid zu beziehen. Der Fokus muss auf der Spezifität der Probenvorbereitung liegen, um das

5. Diskussion

Signal-Rausch-Verhältnis und so die LoD und LoQ nach Aufarbeitung einer vernünftigen Menge Serums zu erniedrigen. Andere Probenvorbereitungen wie SPE mittels C₁₈ Sep Pak Säulen, beschrieben von Kippen et al. [99] und Darby et al. [205] können in Kombination mit den in dieser Arbeit beschriebenen chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen als Ausgangsmethodik zugrunde gelegt werden. Diese Arbeitsgruppen quantifizierten das C-Peptid in Urin, die Serumanalytik erfordert allerdings eine zehnfach höhere Sensitivität. Cabaleiro et al. [300] zeigten kürzlich diese Sensitivität, indem sie das C-Peptid massenspektrometrisch nach SPE-Aufarbeitung im negativen Ionisierungsmodus als Precursor-Ions $[M - 2H]^{2-}$ detektierten.

5.1.3 Orale Antidiabetika

Mit der beschriebenen validierten Methodik ist der quantitative Nachweis der oralen Antidiabetika aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, der Glinide und der Glitazone und der qualitative Nachweis der Dipeptidyl-Peptidase-Hemmstoffe möglich. Die Methodik erlaubt den Nachweis von sehr geringen Konzentrationen, aber auch von Überdosiskonzentrationen. Eine LLE wurde als angemessen angesehen, um die verschiedenen Pharmazeutika aus dem Serum zu isolieren. Verschiedene organische Lösungsmittel (Ethylacetat / Diethylether, n-Chlorobutan, Dichlormethan, Diethylether, TBME) wurden verglichen, um die besten Wiederfindungsraten zu ermitteln. Die Extraktion mit TBME ergab die besten Wiederfindungen. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Strukturen und pK_a der Arzneistoffe wurde TBME bei 2 pHs als Extraktionsmittel benutzt. Der Preis für die Aufnahme aller oralen Antidiabetika in die Methode war die Abnahme der Wiederfindungsraten besonders für Saxagliptin und Vildagliptin. Beide Substanzen besitzen einen relativ hohen pK_a (Saxagliptin 7,3) und einen polaren Charakter aufgrund der Einführung von Amino- und besonders Cyanogruppen ins Molekül und werden mit organischen Lösungsmitteln nicht gut extrahiert. Für alle anderen oralen Antidiabetika war die Wiederfindungsrate hervorragend. Für Vildagliptin und Saxagliptin zeigten sich auch jeweils Präzisionsdaten > 15%. Daher ist die Methode allenfalls bedingt geeignet, um die Gliptine quantitativ nachzuweisen. Ein sicherer qualitativer Nachweis dieser Substanzen mit dieser Methode ist jedoch möglich.

5. Diskussion

5.1.4 Methylglyoxal

Die beschriebene Methodik erlaubt die Quantifizierung des MG in Serum und post mortem Blut. Validierungsparameter waren alle in Übereinstimmung mit den Vorgaben der GTfCh. Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich aber teilweise stark von anderen Studien (siehe Tabelle 10 in Kapitel 1.4.5). Zwei Punkte, die bei anderen Studien Kritik auf sich ziehen könnten, sind Probenvorbereitung und die Herstellung der Kalibrierstandards. Dhar et al. [300] zeigten, dass MG durch Fällung mit sauren Substanzen (wie hier Perchlorsäure) aus seiner hohen Proteinbindung befreit werden muss. Anschließend werden die gefällten Proteine entfernt, während MG frei im sauren Überstand vorliegt. Nach diesem Fällungsschritt muss eine viertelstündige Standzeit der Probe abgewartet werden, in dem MG in saurer Umgebung aus seiner Proteinbindung befreit wird. Die Molarität der sauren Komponente und die Standzeit hatten einen signifikanten Einfluss auf die gemessenen MG-Konzentrationen. 10 Minuten Standzeit nach Fällung mit 7 % Perchlorsäure führte zur besten Freisetzung von MG [301]. Mit diesem Fällungsschritt mit anschließendem Stehenlassen konnten die MG-Konzentrationen bis aufs Zehnfache gesteigert werden.

Durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wird der pH-Wert dann wieder erhöht, um optimale Voraussetzungen für die Derivatisierung und die anschließende Extraktion zu schaffen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der pH nicht zu hoch wird. Gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung selbst besitzt einen pH von 8,4. Bei diesen Bedingungen sind zelluläre Metaboliten wie Triosephosphate instabil und werden zu MG abgebaut. MG selbst ist bei höheren pHs in Lösung instabil. Es unterliegt einer intramolekularen Cannizarro-Reaktion unter Bildung von Laktat [302]. Daher würden höhere pH-Werte als die bei dieser Methode benutzten (pH 5) zu Verfälschungen der Ergebnisse führen. Bei leicht saurem pH werden die genannten Metabolite, die zu MG abgebaut werden können, und MG selbst nach dessen Befreiung aus der Proteinbindung stabilisiert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der anschließenden Derivatisierung mit 2,3-Diaminonaphthalen ist dann die säurekatalysierte Dehydrierung, daher wird die Derivatisierung bei leicht saurem pH-Wert schneller ausgeführt als bei basischem. Die pK_a von 1,2-Diaminobenzol liegen bei 0,8 und 4,6 und sind ähnlich für 2,3-Diaminonaphthalen [303]. Daher ist pH 5 der beste Kompromiss für eine

5. Diskussion

gelungene Derivatisierung, da bei diesem pH noch freie unprotonierte Aminogruppen für eine Reaktion mit den Dicarbonylkomponenten vorliegen.

Zur Verbesserung der Stabilität und der Chromatographie von MG ist ein Derivatisierungsschritt dringend notwendig. Alternativen zum beschriebenen Derivatisierungsschritt umfasst die Reaktion mit dem allerdings explosiven 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) [222] zu Hydrazone-Derivaten. Das Produkt MG-bis-2,4-dinitrophenylhydrazon fällt aber teilweise aus der Lösung aus und beschränkt so die Verlässlichkeit der Methode. Ein weiterer Kritikpunkt dieser Derivatisierungsmöglichkeit ist, dass viele Hersteller zur Verbesserung der Explosionssicherheit des gefährlichen DNPH dieses als wässrige Lösung ohne exakte Gehaltsangabe anbieten. Weitere Derivatisierungsmöglichkeiten bieten *o*-Phenylendiamin [156], Dichloro-1,2-phenylendiamin, 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylendiamin [223], *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamin (PFBOA) [225] oder 9-(3,4-diaminophenyl)acridin [304]. Die „Goldstandard“-Methodik für die Bestimmung von MG beinhaltet allerdings die Reaktion von MG mit reduziertem Glutathion über Hemithioacetal Zwischenstufen zu S-D-Lactoylglutathion, katalysiert durch das Enzym Glyoxylase I. Diese Methodik, zuerst beschrieben durch Racker [305], benötigt aber das Enzym und reduziertes Glutathion, welche beide ziemlich teuer sind. Eine weitere Möglichkeit wurde von Wild et al. [306] aufgezeigt, die die Reaktion von MG mit N-Acetyl-L-cystein zu N- α -Acetyl-S-(1-hydroxy-2-oxo-prop-1-yl) cystein bei Raumtemperatur mit guter Präzision erfassten.

Weiterhin ist wichtig, ob Plasma oder Serum als Matrix gewählt wird und welche Fraktionen von MG mit der Methodik erfasst werden können. Weniger als 1 % des MG liegt frei vor, während mehr als 99 % des Gesamt-MG proteingebunden ist [307, 308]. MG reagiert mit Cystein-, Arginin- und Lysinresten verschiedener Proteine [306]. Die proteingebundene Fraktion kann noch in die irreversibel und reversibel gebundene Fraktion unterteilt werden. Das reversibel gebundene MG scheint in einem dynamischen Equilibrium mit freiem MG zu stehen und kann gemessen werden [309, 310]. Das reversibel gebundene MG ist allerdings sehr variabel und ist sicherlich eine mögliche Fehlerquelle der MG-Analytik. Die irreversible Form bleibt selbst unter relativ extremen Bedingungen (Fällungsschritt) stabil und kann daher nicht mit dieser Methode, aber mit speziellen Assays für AGE [311, 312] detektiert werden.

5. Diskussion

Weiterhin ist die Herstellung der Kalibrierstandards ein wichtiger Punkt. Methanolische MG- und IS-Lösungen verlieren aufgrund der hohen Reaktivität der Dicarbonylgruppen ihren ursprünglichen Gehalt relativ schnell. Die Standards müssen daher immer frisch hergestellt und in einer inerten Umgebung (Helium) gelagert werden. Die kommerziell erhältliche Lösung muss vor Benutzung auf Unreinheiten getestet werden. Wenn die MG-Standards nicht frisch hergestellt werden, werden höhere MG-Konzentrationen gemessen. Es wird angeregt, eine definierte Referenzmethode für MG in biologischem Probenmaterial zu entwickeln und festzulegen.

Auch aus Zellmaterial kann mit dieser Methode MG extrahiert werden. Die Zellwände werden durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff in Lysepuffer lysiert und das Prozedere anschließend wie mit den anderen Matrices fortgesetzt. Die Ergebnisse sind in der Fachliteratur beschrieben [230, 236].

5.1.5 Anhydroglucitol

Die Methode wurde erfolgreich im humanen Serum und post mortem Blut validiert. Das intensivste Ion war im Gegensatz zu anderen Studien [236] das deprotonierte $[M - H^+]^-$ mit einem m/z -Verhältnis von 162,9 für AG und 168,9 für den IS. Die Methode ist begrenzt auf Serum und post mortem FVB als Probenmatrix, für beide wurden gute Ergebnisse in puncto Selektivität und Sensitivität erreicht. Versuche mit Urin als Probenmatrix zeigten bei diesem chromatographischen Setting einen interferierenden Peak im Target- und Qualifierchromatogramm des Analyten. Dies entspricht Onorato et al. [9], die die Selektivität in Urinproben durch die Einführung von MS^3 -Experimenten erhöhen mussten, um interferierende Peaks auszuschließen. Die Sensitivität der Methode ist mit $LoD = 0,55 \mu\text{g/ml}$ ausreichend, da die meisten gemessenen Konzentrationen im Bereich 1-25 $\mu\text{g/ml}$ lagen.

5.2 Klinische Proben

5.2.1 Humanes und synthetische Insuline

Humanes Insulin zeigt über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen nach Probennahme Stabilität im Serum. Daher war es möglich, Proben nach Verschickung aus Bad Oeynhausen innerhalb der ersten Woche nach Probennahme zu

5. Diskussion

vermessen, ohne einen signifikanten Verlust an Analyt verzeichnen zu müssen. werden. Das Gesamtkollektiv der Diabetiker zeigte humane Insulinkonzentrationen, die größer als die Referenzkonzentrationen waren. Dies lag daran, dass sich einige Diabetiker humanes Insulin injiziert hatten oder orale Antidiabetika eingenommen hatten und so den Mittelwert erhöhten. Diabetiker ohne Medikation zeigten mit im Mittel 135 pmol/l Konzentrationen etwa im Referenzbereich (29-188 pmol/l). Typ 2-Diabetiker zeigten signifikant erhöhte Humaninsulin-Konzentrationen im Vergleich mit Typ 1- Diabetikern, bei denen die Sekretion des Humaninsulins nahezu versiegt ist. Bei Einteilung der Diabetes-Patienten nach ihrer Medikation ergaben sich einige interessante Aspekte: Sowohl die Injektion von humanem Insulin als auch die Einnahme von oralen Antidiabetika erhöhen die Humaninsulin-Konzentrationen signifikant. Angesichts der Tatsache, dass eine Einnahme von oralen Antidiabetika nachweisbar ist, muss eine Injektion mit humanem Insulin nur von der endogenen Insulinkonzentration eines Diabetikers ohne Medikation oder eines Nicht-Diabetikers unterschieden werden. Diese liegen bei 135 Diabetikern ohne Medikation bei bis zu 470 pmol/l, Referenzbereiche für Nicht-Diabetiker liegen bei bis zu 1400 pmol/l postprandial [48]. Alle Werte, die über diesen 1400 pmol/l (200 µU/ml) bestimmt werden, sollten den Verdacht auf eine Injektion mit humanem Insulin lenken. So konnten die Insulinkonzentrationen im beschriebenen Fallbeispiel 5.3.10.2 (5180 µU/ml = 37369 pmol/l) leicht auf die Injektion von humanem Insulin zurückgeführt werden. Allerdings überlappen sich die Konzentrationen, sodass eine Konzentration < 1400 pmol/l auf keinen Fall eine Injektion mit humanem Insulin ausschließen sollte. Im Kollektiv der Diabetiker in Therapie mit humanem Insulin kamen Konzentrationen ab 26,4 pmol/l vor, die nicht direkt auf eine Injektion schließen lassen könnten. Will man falsch positive Ergebnisse vermeiden und setzt die Grenze für die Injektion mit humanem Insulin auf > 500 pmol/l Nüchtern-Insulinkonzentration (Selektivität 100 %), ergibt sich eine Spezifität von nur 30 %. Marks [105] beschreibt die in 29 Fällen von Insulinmord per Immunoassay gemessenen Insulinkonzentrationen als 234-323600 pmol/l (Mittel 63000 pmol/l). Nur in 4 Fällen war die Insulinkonzentration < 1000 pmol/l. Daraus folgernd sollte man die absolute Konzentration von humanem Insulin zur Beurteilung der Ursache einer Hypoglykämie durchaus zu Rate ziehen, die zusätzliche C-Peptid-Analytik ist aber unerlässlich.

5. Diskussion

Einige Arbeitsgruppen hatten postuliert, dass in Fällen einer nicht durch Insulin ausgelösten Hypoglykämie Insulinkonzentrationen $< 29,8 \text{ pmol/l}$ ($< 4,14 \text{ } \mu\text{U/ml}$) [106] bzw. $< 35,8 \text{ pmol/l}$ ($< 4,97 \text{ } \mu\text{U/ml}$) [313] auftreten. Bei allen drei Diabetikern in diesem Kollektiv, die unter einer Hypoglykämie litten, wurden Insulinkonzentrationen $< \text{LoQ}$ ermittelt.

Der Nachweis von synthetischen Insulinen gelang mit Hilfe der beschriebenen Methodik in vielen Fällen und zeigte die in Tabelle 25 aufgeführten Konzentrationsbereiche. Im beschriebenen Patientenkollektiv wies keiner der Diabetiker nach Therapie mit synthetischen Insulinen eine Hypoglykämie auf. Gleichwohl können Überdosen zu diesen Stoffwechselentgleisungen führen. Seit der Einführung der Insulinanaloge sind in der Literatur einige Fälle beschrieben, die meisten für Insulin glargin (Lantus[®]): Ein Mann injizierte sich in einem Suizidversuch an mehreren Körperstellen 150 U Lantus[®] [314]. Lantus[®] wird üblicherweise einmal am Tag gegeben, da es eine mutmaßliche HWZ von ca. 24 h und dabei keinen Wirkungshöhepunkt aufweist. Die normale Tagesdosis beträgt bis zu 20 U. Im Falle dieser Überdosierung mit 150 U erfolgte eine starke Fluktuation der Glucosekonzentration auch nach Behandlung, so dass angenommen wurde, dass die Bolusinjektion mit großer Dosis langsam aus einem subkutanen Depot freigesetzt wurde. Bis zu 72 Stunden nach der Injektion litt der Patient noch unter Hypoglykämien. Die Absorption von Lantus[®] kann ebenfalls durch das Ausweichen auf mehrere Injektionsstellen erhöht werden. Ein anderer Suizidversuch mit 24 U Lantus[®] [315] misslang. Zweieinhalb Stunden nach der Injektion wurde eine Frau komatös (Blutglucosekonzentration von 31 mg/dl) aufgefunden. In diesem Fall reichte also schon die doppelte tägliche Dosis aus, eine lebensgefährliche Hypoglykämie zu erwirken. Das Ausmaß einer Hypoglykämie für Lantus[®] ist also nicht dosisabhängig. Die Dauer einer Hypoglykämie nach der Injektion von NPH (neutral protamin human) Insulin ist im Gegensatz dazu dosisabhängig; eine Hypoglykämie, die länger als 54 Stunden dauerte, wurde nur nach einer massiven Überdosis beobachtet [316]. Auch im beschriebenen Fall führten ca. 600 U Normalinsulin zu einer 72 Stunden andauernden Hypoglykämie (5.3.10.2). Der Mechanismus der länger andauernden hypoglykämischen Episoden nach Lantus[®]-Injektion ist unklar, es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach einer Standarddosis mit radioisotop-gekennzeichnetem Lantus[®] die Radioaktivität in der Injektionsstelle noch 48 Stunden nach Injektion detektiert werden konnte [317]. Ein weiterer Suizidversuch mit 2700 U Lantus[®] wurde

5. Diskussion

berichtet [318]. Erst 16 h nach der Injektion wurde die Patientin mit einer Blutglucosekonzentration von 29 mg/dl eingeliefert. In einem weiteren Fall [319] musste das Injektionsareal nach Injektion von 4800 U Lantus[®] ausgeschnitten werden, um den Patienten zu retten.

Ein weiteres Insulinanalogon, für das Hypoglykämien beschrieben wurden, ist Insulin lispro (Humalog[®]). Das schnell wirksame Analogon beginnt schon nach 10-30 min zu wirken, nach 30-120 min hat es seinen Wirkungshöhepunkt. So wurde eine Frau [101] schon 30 min nach der Injektion von 300 U Humalog[®] komatös (Glucose 7 mg/dl) ins Krankenhaus gebracht. Die hypoglykämischen Episoden dauerten 11 h an.

5.2.2 C-Peptid

Typ 2-Diabetiker, bei denen die Proinsulin-Sekretion und dementsprechend auch die C-Peptid-Sekretion noch intakt ist, zeigten signifikant höhere C-Peptid-Konzentrationen als Typ 1-Diabetiker, bei denen die endogene Sekretion weitestgehend eingestellt ist. Erhöhte C-Peptid-Konzentrationen (> 1000 pmol/l) bei Typ 2-Diabetikern im Vergleich zu Normalpersonen sind auf die Insulinresistenz der Gewebe und dem darauf folgenden Versuch des Körpers zurückzuführen, die fehlende Reaktion auf Insulin- und C-Peptid-Sekretion durch vermehrte endogene Produktion aufzuheben. Im Spätstadium eines Diabetes Typ 2 kann es aber auch durchaus vorkommen, dass bei Versagen der Insulin- und der C-Peptid-Produktion C-Peptid-Konzentrationen erniedrigt sind. Bei Einteilung der Diabetes-Patienten nach ihrer Medikation ergaben sich einige interessante Aspekte: Sulfonylharnstoffe und andere orale Antidiabetika erhöhen aufgrund ihres Wirkmechanismus die endogenen C-Peptid-Konzentrationen. Die niedrigsten gemessenen C-Peptid-Konzentrationen nach Einnahme von Sulfonylharnstoffen betragen 970 pmol/l. Nach Injektion von humanem Insulin oder synthetischen Insulinen erniedrigt sich die C-Peptid-Konzentration, aber nicht signifikant. Auch im beschriebenen Fall (5.3.10.2) wurde eine eher niedrige C-Peptid-Konzentration detektiert (336 pmol/l). Nach Injektion mit humanem Insulin wurden Konzentrationen bis zu 4600 pmol/l C-Peptid gefunden. Im Gegensatz dazu wurden auch bei Diabetikern ohne Medikation extrem niedrige C-Peptid-Konzentrationen $< \text{LoQ}$ gefunden. Dies lässt den Schluss zu, dass eine niedrige C-Peptid-Konzentration per se zwar einen Hinweis auf eine exogene Gabe von Insulin geben kann, aber nur in Relation zur Insulinkonzentration Aussagekraft besitzt.

5. Diskussion

5.2.3 Das molare Verhältnis humanes Insulin : C-Peptid

Für Diabetiker ohne Medikation wurden im Mittel Nüchtern-I:C-Verhältnisse von 0,13 ermittelt. Diese liegen in etwa im Bereich der mittels Immunoassay ermittelten Verhältnisse aus der Literatur, die für Nicht-Diabetiker mit 0,13 [92] bzw. 0,1 [101] beschrieben werden. Diese können postprandial auf 0,19 [85] bzw. 0,12 [253] leicht ansteigen. Die C-Peptid-Konzentrationen sind also meist 5-10fach höher als die entsprechenden Insulinkonzentrationen im Serum, das Verhältnis steigt aber nach dem Essen leicht an. Unsere Beobachtungen können sich also nur auf nüchterne Patienten beziehen. Diabetiker haben I:C-Verhältnisse in derselben Größenordnung wie gesunde Personen. Die Injektion von humanem Insulin erhöht die I:C-Verhältnisse signifikant. Die gängige Meinung, dass I:C-Verhältnisse > 1 klar für eine Injektion mit Insulin sprechen [92], wird hier allerdings nicht bestätigt. Zwei Patienten, die sich nicht humanes Insulin injiziert hatten, sondern nur synthetische Insuline bzw. orale Antidiabetika eingenommen hatten, erreichten ein I:C von > 1 . Auch 19 von 30 Patienten, die sich nur humanes Insulin injiziert hatten, zeigten I:C < 1 . Die Einnahme von oralen Antidiabetika dagegen verändert die I:C-Verhältnisse im Vergleich zu Diabetikern ohne Medikation nicht, da orale Antidiabetika aufgrund ihres Wirkmechanismus sowohl die Humaninsulin- als auch die C-Peptidkonzentrationen ansteigen lassen.

Da eine Injektion synthetischer Insuline bzw. die Einnahme oraler Antidiabetika mit unseren Methoden leicht als Ursache einer Hypoglykämie detektiert werden können, muss nur eine Abgrenzung von Diabetikern ohne Medikation zu Diabetikern nach Injektion von humanem Insulin geschaffen werden. Bei einem Cut Off des Nüchtern-I:C-Verhältnisses von 0,22 erreicht man eine Sensitivität von 100 % und eine Selektivität von 87,2% für die Abgrenzung zur Gruppe „orale Antidiabetika“ und 81,3% für die Abgrenzung zur Gruppe „keine Medikamenteneinnahme“. Im beschriebenen Fallbeispiel (5.3.10.2) lag das I:C-Verhältnis mit 111 deutlich über diesen Cut-Offs.

5.2.4 Proinsulin

Proinsulin-Konzentrationen von Diabetikern lagen im Mittel bei 9,82 pmol/l. Im Bereich des in der Literatur beschriebenen Referenzbereichs für Proinsulin-Konzentrationen von < 11 pmol/l liegen 66,2 % der Fälle ($n = 266$), während 33,8 % ($n = 136$) der Fälle über 11 pmol/l lagen. Nüchtern-Proinsulin-Konzentrationen, wie

5. Diskussion

sie hier gemessen wurden, wurden bei Gesunden mit $6,7 \pm 1,7$ pmol/l [320], $2,2-6,2$ pmol/l [9], postprandial mit $8,5-11,3$ pmol/l [105] beschrieben. Damit liegen die meisten der Diabetiker über den Referenzkonzentrationen. Der bei uns ermittelte signifikante Unterschied der Proinsulinsekretion zwischen Männern und Frauen wurde bisher noch nicht beschrieben. Typ 2-Diabetiker, bei denen die Proinsulinsekretion noch intakt ist, zeigten signifikant höhere Proinsulin-Konzentrationen als Typ 1-Diabetiker, bei denen die endogene Sekretion weitestgehend eingestellt ist. Weiterhin besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der schon bekannten Länge der Diabeteserkrankung und der Proinsulinsekretion. Bei Diabetikern, die von Ihrer Krankheit erst vor Kurzem erfahren, ist die Proinsulin-Sekretion noch ausgeprägt, während bei Langzeit-Diabetikern Proinsulinkonzentrationen > 10 pmol/l nicht mehr auftreten.

Bei Einteilung der Diabetiker nach ihrer Medikation ergaben sich folgende Aspekte: Sulfonylharnstoffe und andere orale Antidiabetika erhöhen aufgrund ihres Wirkmechanismus die Proinsulinkonzentrationen signifikant. Eine Therapie mit synthetischem oder humanem Insulin hat keinen Einfluss auf die mittleren Proinsulinkonzentrationen. Auch gibt die Proinsulin-Konzentration keinen Hinweis darauf, ob ein Diabetiker sich gerade Insulin injiziert hat oder nicht. Auch im beschriebenen Fall 5.3.10.2 wurde eine Proinsulin-Konzentration im Normbereich ($5,3$ pmol/l) detektiert. Einige Arbeitsgruppen hatten sich mit den Proinsulin-Konzentrationen im Falle einer Hypoglykämie auseinandergesetzt und diese als < 20 pmol/l [107] bzw. < 5 pmol/l [321, 322] beschrieben. Die Proinsulinsekretion wird also wie die endogene Insulin- und C-Peptid-Sekretion durch eine Hypoglykämie unterdrückt. Aus der Gegenüberstellung von Glucose und Proinsulin (Abbildung 34) lässt sich erkennen, dass in den 28 Fällen einer Glucosekonzentration < 100 mg/dl stets eine Proinsulin-Konzentration < 15 pmol/l vorherrschte (Sensitivität 100 %). Damit ist eine niedrige Proinsulin-Konzentration ein Indiz für eine hypoglykämische Episode, nicht jedoch ein absoluter Beweis, da die Spezifität in diesem Fall sehr niedrig ist und selbst bei stark hyperglykämischen Patienten niedrige Proinsulin-Konzentrationen vorkommen.

5.2.5 Orale Antidiabetika

Orale antidiabetische Medikation kann ebenfalls zur Ausbildung einer Hypoglykämie führen. Vor allem Sulfonylharnstoffe wurden schon häufig als Suizidmittel

5. Diskussion

beschrieben [129]. Als unerwünschte Nebenwirkung treten Hypoglykämien meist in den ersten 6 Wochen der Therapie auf [323]. Die gastrointestinale Absorption von Sulfonylharnstoffen (in Deutschland sind aktuell mit Glimperid, Glibenclamid, Gliclazid und Gliquidon 4 auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich) erfolgt innerhalb von 15 Minuten nach Einnahme [324]. Die Peakplasmakonzentrationen werden nach Einnahme therapeutischer Dosen innerhalb von 2-12 h erreicht [129]. Im Allgemeinen korreliert die biologische Wirkdauer aber nicht mit der Plasmahalbwertszeit (pharmakokinetische Daten in Kapitel 1.4.4). Wegen der Anreicherung der Sulfonylharnstoffe im Gewebe halten Hypoglykämien oft länger an, als aufgrund der HWZ zu erwarten wäre [325, 326]. Alle ermittelten Serumkonzentrationen der Sulfonylharnstoffe bei Diabetikern lagen hier unterhalb dieser beschriebenen Peakplasmakonzentrationen. Die Peakplasmakonzentrationen gehen mit dem Einsetzen der Hypoglykämien einher. Diese setzen bei diesen Wirkstoffen normalerweise in den ersten 8 h nach Einnahme ein, kann aber bis zu 12 Stunden verzögert sein [327]. In Überdosissituationen können die Hypoglykämien bis zu 72 Stunden andauern [328]. Hypoglykämien können auf die falsche Dosierung, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, verzögerten Metabolismus oder erniedrigte Ausscheidung zurückzuführen sein. Die Wirkstoffe haben einen engen therapeutischen Index und so gab es Fälle von Hypoglykämien bei Kindern nach Einnahme von nur einer Tablette Glipizid [329]. Das Einsetzen der Hypoglykämien ist nicht von der Dosis abhängig, das Potential steigt aber mit höheren Dosen besonders bei älteren Patienten [330].

Glinide weisen denselben Wirkmechanismus wie Sulfonylharnstoffe auf. Ein Selbstmordversuch mit Nateglinid wurde beschrieben [331]. Die Patientin hatte 3420 mg Nateglinid eingenommen, was zu einer Blutglucosekonzentration 1 h nach Einweisung ins Krankenhaus von 36 mg/dl führte. Eine Stunde später war die Glucosekonzentration nach Behandlung auf 56 mg/dl gestiegen, sank aber 2 Stunden später wieder auf 22 mg/dl ab. Die hypoglykämischen Effekte von Nateglinid dauerten 6 h nach Einlieferung der Patientin an. In einem Rattenversuch mit Nateglinid führte das Antidiabetikum schon nach einer Stunde zu einem dosisabhängigen Abfall der Glucosekonzentration. Die maximalen Plasmakonzentrationen (1000-3000 ng/ml) wurden 0.5-1,5h nach einer Einzeldosis von 60 mg ermittelt, die Wirkung hielt aber nicht länger als 3 h an [332].

5. Diskussion

Auch Repaglinid führte zu einer unbeabsichtigten Hypoglykämie in klinischer Dosierung 4-6 h nach Einnahme [333]. Ein junger Mann wurde mit den folgenden Laborwerten eingeliefert: Glucose 19 mg/dL, Insulin 395 pmol/L (normal 145-323 pmol/l), C-Peptid 2966 pmol/L, Proinsulin 44 pmol/l (normal: < 11 pmol/l). Die erhöhten Konzentrationen der Peptide ließen auf eine Einnahme oraler Antidiabetika schließen. Repaglinid wurde in Konzentrationen zwischen 4,8 und 20,7 ng/ml gefunden. Peakplasmakonzentrationen von Repaglinid wurden mit 105 ng/ml 0,5-1,5h nach einer Einzeldosis von 2 mg beschrieben. Repaglinid hat eine kurze HWZ von 1,0-1,4 h und dadurch eine kurze Wirkdauer [334].

Während einer Pubmed-Recherche konnten keine Fälle einer Thiazolidindion-Überdosis gefunden werden.

Bei Dipeptidyl-Peptidase-Inhibitoren kommen schwere Hypoglykämien ebenfalls nur recht selten vor. Die Inzidenz von Hypoglykämien in einer randomisierten kontrollierten Studie in Japan über eine Reihe von Sitagliptin-Dosen (50, 100 und 200 mg) betrug 1,3-4,4 % [335]. So beschreiben Furukawa et al. den Fall einer Frau, die einen Suizid mit Sitagliptin versuchte. Sie hatte 1700 mg Sitagliptin eingenommen, das mehr als 30fache der gängigen Tagesdosis. Bei Einlieferung wies sie trotzdem eine relativ normale Glucosekonzentration von 124 mg/dl auf und auch in den folgenden Tagen schwankte der Glucosewert nach Glucoseinfusion im normoglykämischen Bereich. Sitagliptin-Konzentrationen erreichten 1544 ng/ml 16 h und 279 ng/ml 7 Tage nach Einlieferung. Bei einer pharmakokinetischen Studie mit gesunden Freiwilligen wurden die c_{max} und t_{max} nach Einnahme von 400 mg bzw. 800 mg folgendermaßen bestimmt: 1481 ng/ml nach 1,5 h für 400 mg und 4518 ng/ml nach 1 h für 800 mg. Die von uns ermittelten Konzentrationsbereiche bei 58 Diabetikern lagen zwischen < LoQ und 670 ng/ml [150-152, 156].

5.2.6 Methylglyoxal

In Übereinstimmung mit anderen Studien [153] zeigten Diabetiker mit chronischer Hyperglykämie in Kliniken signifikant ($p < 0,001$) höhere Serumkonzentrationen als Nicht-Diabetiker. Typ 1- und Typ 2-Diabetiker zeigten keine Unterschiede. Der Grund dafür ist, dass MG hauptsächlich aus Glucose gebildet wird und die MG-Konzentrationen unabhängig von der Ursache einer Hyperglykämie steigen. Die Konzentrationen waren im Einklang mit einer früheren Studie [336, 337] und lagen

5. Diskussion

innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches (67% aller diabetischen Patienten zeigten MG Konzentrationen innerhalb 60-100 ng/ml).

5.2.7 Anhydroglucitol

Wie schon von Won et al. beschrieben [232], zeigen Diabetiker mit chronischer Hyperglykämie in den hier vorgenommenen Untersuchungen signifikant ($p < 0,001$) niedrigere mittlere AG-Serumkonzentrationen als Nicht-Diabetiker. Die Diabetiker wiesen im Mittelwert Konzentrationen von $5,74 \mu\text{g/ml}$ ($< \text{LoQ}-31,4 \mu\text{g/ml}$), Nicht-Diabetiker Konzentrationen von $23,3 \mu\text{g/ml}$ auf. Ähnliche Konzentrationen sind in der Literatur beschrieben. Tanaka et al. [338] ermittelten AG-Konzentrationen von $24,6 \pm 7,2 \mu\text{g/ml}$ bei Gesunden, Won et al. [232] von $24,6 \pm 6,2 \mu\text{g/ml}$ ($17,9-36,6 \mu\text{g/ml}$). In dieser Studie zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Typ 1-Diabetikern und Typ 2-Diabetikern. Auch Tanaka et al. [338] ($7,7 \pm 7,2 \mu\text{g/ml}$ bei Typ 2- und $2,7 \pm 2,7 \mu\text{g/ml}$ bei Typ 1-Diabetikern) ermittelten Konzentrationsunterschiede. Won et al. [339] ermittelten höhere Konzentrationen bei Typ 2-Diabetikern ($18,0 \pm 7,0 \mu\text{g/ml}$). Dies konnte schon in einer früheren Studie gezeigt werden [339], in der ein signifikanter Unterschied zwischen fulminanten Typ 1-Diabetikern ($3,3 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) und Typ 2-Diabetikern ($13,5 \pm 5,4 \mu\text{g/ml}$) beschrieben wurde. Typ 1-Diabetiker zeigten in unserer Studie ähnliche Konzentrationen (MW $3,02 \mu\text{g/ml}$), die Konzentrationen von Typ 2-Diabetikern lagen allerdings deutlich darunter (MW $6,26 \mu\text{g/ml}$). Koga et al. [235] zeigten weiterhin, dass Patienten mit fulminantem Typ 1 Diabetes in 6 von 7 Fällen Konzentrationen $< 5 \mu\text{g/ml}$ zeigten, während Typ 2-Diabetiker AG-Konzentrationen $< 5 \mu\text{g/ml}$ nur in 1 von 32 Fällen aufwiesen. Dies konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden, auch Typ 1-Diabetiker zeigten Konzentrationen $> 10 \mu\text{g/ml}$. Beschriebene geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in diesem Kollektiv allerdings nicht beobachtet. Li et al. [159] hatten gezeigt, dass AG-Konzentrationen bei Gesunden bei $18,96 \pm 5,71 \mu\text{g/ml}$ ($n = 185$) für Frauen und $28,97 \pm 7,57 \mu\text{g/ml}$ ($n = 82$) für Männer lagen ($p < 0,001$). Bei Typ 2-Diabetikern zeigte sich dieses Phänomen nicht ($7,62 \pm 5,52 \mu\text{g/ml}$ bei 55 männlichen und $6,59 \pm 5,20 \mu\text{g/ml}$ bei 104 weiblichen Typ 2-Diabetikern). Li et al. hatten daraufhin geschlechtsspezifische Referenzintervalle vorgeschlagen.

Wenn eine AG- Konzentration von $> 10 \mu\text{g/ml}$ im Serum als ein Kriterium für gut-kontrollierten Diabetes mellitus herangezogen wird [338], waren die meisten der Patienten in dieser Studie unter dieser Grenze und schlecht eingestellt. Tatsächlich

5. Diskussion

zeigten nur 69 von 434 Diabetikern (15,9 %) eine AG Konzentration $> 10 \mu\text{g/ml}$. Die Patienten der Studie befanden sich allerdings fast alle in Situationen, in denen der Glucosemetabolismus kurze Zeit vorher entgleist war. Daraufhin waren die Patienten ins Krankenhaus eingeliefert worden. Dies könnte die niedrigeren AG-Konzentrationen im Vergleich zu anderen Studien erklären. Nicht-Diabetiker zeigten nur in 4 von 116 Fällen Konzentrationen $< 10 \mu\text{g/ml}$.

Der weitere Langzeitmarker HbA1c korreliert mit AG. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass nur 22 der 69 Diabetiker mit $< 10 \mu\text{g/ml}$ einen erhöhten ($> 7,5 \%$) HbA1c-Wert aufwiesen. Auch Won et al. [338] hatten einen linearen Zusammenhang zwischen AG und HbA1c ($R^2 = 0,208$; $p < 0,001$) ermitteln können. Mit der Nüchtern-Insulin-Konzentration korrelierte AG allerdings nicht ($R^2 = -0,02$; $p = 0,77$). In unserer Studie korrelierte die AG-Konzentration nur schwach mit der aktuellen Nüchtern-Glucose-Konzentration. Eine Assoziation zwischen AG und der postprandialen Plasmaglucose bei Patienten mit normaler glykämischer Stoffwechsellage oder gut eingestelltem Diabetes, nicht aber bei extremen Hyperglykämien, ist allerdings gegeben [158].

AG-Konzentrationen normalisieren sich signifikant über einen Zeitraum von mehreren Tagen im Anschluss an eine ausgeprägte Hyperglykämie [340, 341]. Außerdem haben Unterschiede in der individuellen renalen Schwelle für Glucosurie oder Schwankungen in der Hämoglobin- oder Lipidfraktion keine Änderungen der AG-Konzentrationen zur Folge [342].

Einschränkungen für diesen Marker wurden beschrieben: der urämische Zustand [343] oder der Leberzustand [344], Ernährung [345], populationsgenetische Abstammung [346] und die Nierenfunktion [158, 234] haben einen Einfluss auf die AG-Konzentrationen im Serum. Weiterhin ist bei Patienten mit extremen Hyperglykämien die Bestimmung des AG weniger anfällig gegenüber mäßigen Veränderungen des glykämischen Status [347].

5.2.8 Hypoglykämien im Straßenverkehr

Da vorwiegend Hypoglykämien, nicht aber Hyperglykämien akut Probleme im Straßenverkehr hervorrufen können, wird der Nachweis einer Hypoglykämie hier diskutiert. Eine beträchtliche Zahl von Unfällen wird durch eine Unterzuckerung am Steuer hervorgerufen. In einem solchen Fall ist es vonnöten, die glykämische Situation des Patienten sofort abzuklären. Gleichzeitig sollte zum schnellstmöglichen

5. Diskussion

Zeitpunkt ein Blutröhrchen gesammelt werden, das zur Verhinderung der Glykolyse mit Natriumfluorid versetzt wird. Neben der schnellen Blutentnahme sollten während der Anamnese und später im forensisch-toxikologischen Labor folgende Fragen beantwortet werden.

1. Die Anamnese: Die Aufklärung eines hypoglykämischen Status im Lebenden basiert zunächst auf dem Erkennen der bekannten Symptome (1.1.2.2). Weitere Hinweise in einem Straßenverkehrsfall, die darauf hindeuten, dass die Fahrunsicherheit eine Hypoglykämie zur Ursache hatte, sind:

- offensichtlich grundlos untypisches Verhalten;
- Umstände, die das Entstehen einer Hypoglykämie prädisponieren wie z.B. ein ausgelassenes Essen, viel Sport, psychischer Stress, Sekundärleiden, Schlaflosigkeit, Alkohol, Leberbeschwerden, Sucht oder häufige dokumentierte hypoglykämische Episoden. Personen, die unter einem Insulinom leiden, weisen die Symptome der Hypoglykämie häufiger postprandial (manchmal nur dann) auf [83], während Personen mit einer Überdosis Insulin oder oralen Antidiabetika unabhängig von der Nahrungsaufnahme unregelmäßig hypoglykämische Episoden durchlaufen.
- die Umkehr von den typischen hypoglykämischen Symptomen zur "Normalität" sollte durch einen Arzt am Tatort dokumentiert werden. Die Symptome der Hypoglykämie sind unspezifisch (I) und so ist es notwendig, die niedrige Blutglucosekonzentration zur Zeit der Symptome nachzuweisen (II) und aufzuzeigen, dass die Symptome und das unnatürliche Verhalten des Betroffenen durch Glucosegabe nachlassen (III) (Whipple's Triade). Die primäre Unterschied zwischen Insulin-induzierter Hypoglykämie und anderen Ursachen besteht im signifikant erhöhten Bedarf an Glucose. Daher sollte initial geringes Ansprechen auf eine intravenöse oder orale Glucosegabe den Verdacht einer Überdosis mit Insulin oder oralen Antidiabetika erregen [348].
- Patienten mit einer Hypoglykämie zeigen nach dem Abklingen der Symptome häufig eine Amnesie der Ereignisse, die gerade passiert waren.

2. Wurde die Hypoglykämie durch Insulin oder orale Antidiabetika hervorgerufen oder etwa durch eine Krankheit selbst (z.B. Diabetes, Insulinom)?

5. Diskussion

Der Nachweis von synthetischen Insulinen bzw. oralen Antidiabetika kann im Labor durch die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden bewerkstelligt werden. Dazu muss das Blutserum im Labor schnellstmöglich von den roten Blutkörperchen getrennt werden, um eine Hämolyse und daraus resultierenden Kontakt des Hämoglobin-Moleküls mit Insulin zu verhindern. Bis zur Analyse auf humanes oder synthetische Insuline sollte das Gefäß bei -20 °C gelagert werden. Zum Nachweis einer Injektion von humanem Insulin muss sich eine Analyse auf das C-Peptid anschließen. Die Interpretation der Ergebnisse fällt dann allerdings schwer. Ein alleiniger Nachweis eines synthetischen Insulins oder eines hohen I:C-Verhältnisses ist nicht ausreichend. Die zur Tatzeit vorherrschende Hypoglykämie als Folge dieser Insulininjektion muss festgehalten worden sein, um die Ursache von Fahrauffälligkeiten erklären zu können. Natürlich ist es wahrscheinlich, dass ein gleichzeitiger Nachweis einer Hypoglykämie und eines Insulins / oralen Antidiabetikums die Ursache der Hypoglykämie erklärt. Andererseits ist die Entstehung einer Hypoglykämie bei Einnahme von oralen Antidiabetika konzentrationsunabhängig (siehe Kapitel 5.2.5). Normale Plasmakonzentrationen für synthetische Insuline sind in Kapitel 4.2.4.3 aufgeführt.

3. Handelte der Beschuldigte sorglos, indem er zu viel Insulin spritzte oder zu wenig aß?

Typ, Menge und Zeit der letzten Insulininjektion und der letzten Nahrungsaufnahme sollten in einem Diabetestagebuch aufgezeichnet werden. Es wäre schwer, zu argumentieren, wenn sich die Hypoglykämie eine Stunde nach einem Festessen ereignete.

4. Handelte der Beschuldigte sorglos, indem er zusätzlich Alkohol oder Drogen einnahm?

Wusste der Beschuldigte über die Effekte von Alkohol Bescheid, der schon in kleinen Dosen Hypoglykämien hervorrufen kann [349]? An einen Ethanolnachweis im Blut sollte bei Ausbleiben eines Nachweises von Insulin oder oralen Antidiabetika gedacht werden.

5. Handelte der Beschuldigte anderweitig sorglos?

Sorglosigkeit im Falle eines Verkehrsunfalls kann nach § 21 FeV angenommen werden, wenn Diabetiker nicht alles Notwendige tun, um sich und andere Verkehrsteilnehmer nicht in Gefahr zu bringen. Dies impliziert, dass bevorstehende

5. Diskussion

Hypoglykämien erkannt und verlässlich behandelt werden: die Fahrer sollten immer einen Vorrat an schnell resorbierbaren Kohlenhydraten in ihrem Fahrzeug mitführen. Weiterhin sollten Autofahrer mit Diabetes nachweisen können, dass sie ihre Blutglucosekonzentration vor dem Fahrtantritt (§2 StVZO - Pflicht zur Einschätzung der eigenen Verkehrsfähigkeit vor Fahrtantritt) gemessen haben, alle 2 Stunden eine Fahrtpause eingelegt haben, um erneut ihre Blutglucosekonzentration zu messen und sich dementsprechend Nahrung zuzuführen [350]. Im Falle erster Anzeichen einer Hypoglykämie (siehe 1.1.2.2) muss die Fahrt sofort abgebrochen werden; die Fahrt darf erst fortgesetzt werden, wenn nach der Einnahme von Kohlenhydraten die hypoglykämischen Symptome abgeklungen sind. Das Wiedererlangen der normalen kognitiven Fähigkeiten nach einer hypoglykämischen Attacke dauert normalerweise 40-90 min [351]. Weiterhin sollte die Blutzuckereinstellung alle 6 Wochen beim Arzt überprüft werden.

6. War dem Beschuldigten überhaupt bewusst, dass Insulin möglicherweise hypoglykämische Episoden bewirken könnte? Hatte die Person zuvor hypoglykämische Attacken erlitten? Wann zuletzt? Zeigten sich ähnliche Symptome während einer früheren Hypoglykämie beim Beschuldigten?

Im deutschen Strafrecht beschreiben §§20, 21 und 42b StGB, §3 JGG die Zurechenbarkeit und die deutliche Abnahme der Fähigkeit, seinen eigenen Willen im Falle einer Hypoglykämie auszuführen. Laut diesen Paragraphen kann ein Freispruch nur erfolgen, wenn hypoglykämische Episoden vorher nicht auftraten.

7. Nahm der Beschuldigte die Symptome der Hypoglykämie überhaupt wahr?

Dies ist ein schwieriger Punkt, da Diabetiker die ersten Anzeichen einer Hypoglykämie unterschiedlich wahrnehmen [349]. Das rechtzeitige Bemerkens der Unterzuckerung hängt von der Abnahmerate der Blutglucosekonzentration und vom Ausmaß der Gegenregulation durch andere Hormone ab [349, 352]. Eine sogenannte „hypoglycaemia unawareness“ (HU) kann in 25% aller Typ 1-Diabetiker beobachtet werden [353, 354]. Diese unterliegen einem höheren Risiko eine Hypoglykämie zu erleiden. Die „hypoglycaemia unawareness“ ist definiert als das fehlende Wahrnehmungsvermögen für vegetative und neuroglykopenische Symptome und das Ausbleiben gegenregulierender Aktivität, hauptsächlich aufgrund der unterdrückten Ausschüttung von Adrenalin [355]. Einige Patienten mit HU bemerken schließlich die Symptome, aber bei viel niedrigeren

5. Diskussion

Blutglucosekonzentrationen. Bei Patienten, deren Krankengeschichte chronische oder periodische Hypoglykämien anzeigt, tritt HU häufiger auf, da die Gehirnfunktion „geschützt“ ist und die kognitive Dysfunktion bei niedrigeren Glucosekonzentrationen beginnt [356]. Falls Hypoglykämien häufiger auftreten, wird der Glucosetransport ins Gehirn beschleunigt. Dies bewirkt die in diesen Fällen paradoxe Situation einer niedrigen Glucosekonzentration im Blut (Hypoglykämie), aber normalen Glucosekonzentrationen im Gehirn und dadurch das Ausbleiben einer Neuroglykopenie. Das erklärt das Fehlen von insbesondere vegetativen Antworten des Gehirns. Der Verlust des Bewusstseins kann hier sehr schnell vonstatten gehen. Weitere Risikofaktoren für HU sind Alkoholeinnahme [349], höheres Alter, Langzeitdiabetes, Neuropathie, normale HbA1c-Werte, der falsche Insulintyp oder zu ambitionierte Therapieziele [357, 358]. Das Phänomen der HU in Verkehrsunfällen wurde in der Literatur nicht häufig diskutiert, aber einige Arbeitsgruppen waren der Meinung, dass eine HU eine absolute Kontraindikation für das Führen eines Fahrzeugs im Straßenverkehr darstellen sollte [359].

Zur Schuldfähigkeit der Fahrer im Falle einer Hypoglykämie hat sich vor allem die britische Rechtsprechung in einigen Fällen geäußert. Ein neu diagnostizierter Diabetiker gab an, während der Fahrt hypoglykämisch gewesen zu sein und in der Vergangenheit noch nie in einem solchen Zustand gewesen zu sein. Er wurde als nicht schuldig befunden, da er nach Aussage des Richters theoretisch „das Fahrzeug nicht selbst gefahren hat“ [360, 361]. Dieselben Umstände und dieselbe Verteidigung wurden in zwei weiteren Fall vorgetragen [362]. Doch in diesen Fällen war der Diabetes schon länger bekannt und den Fahrern war aufgrund früherer dokumentierter Hypoglykämien bewusst, dass sie während der Fahrt ohne Vorwarnung fahruntfähig werden könnten. So hätten sie anhalten müssen und andere nicht in Gefahr bringen dürfen. Da sie dies nicht gemacht hatten, hatten sie laut Richter sorglos gehandelt und wurden dafür haftbar gemacht. Einen besonderen Fall beschreibt Bovill 1973 [363]. Eine Anklage wegen fahrlässiger Tötung durch Verkehrsunfall wurde aufgrund der Tatsache fallengelassen, dass der Fahrer vor dem Vorfall eine spontane „reaktive Hypoglykämie nach der Einnahme von Zucker“ erlitten habe. Die Stoffwechselsituation wurde einige Zeit nach dem Vorfall mittels zweier oraler Glucosetoleranztests nachempfunden. In einem weiteren Fall [364] hielt das Berufungsgericht eine Verurteilung aufgrund der Verursachung eines Verkehrsunfalls aufrecht. Die Amtsrichter hatten einen Fahrer mit dem Hinweis

5. Diskussion

„Automatismus aufgrund einer Hypoglykämie“ freigesprochen. Beteiligt an diesem Unfall war ein Diabetiker, der das Einsetzen einer Hypoglykämie nicht bemerkte. Diese wurde auf seine erniedrigten Insulinbedürfnisse nach einer Hepatitis-erkrankung und die dadurch erniedrigte Gegenregulation bei Glucosstoffwechsellentgleisungen zurückgeführt. Im Gegensatz zu diesem Fall hatte die Verteidigung „Automatismus“ in einem britischen [365] und im folgenden deutschen Fall aus dem Jahre 1957 [260] Erfolg: Ein 49-jähriger Gynäkologe wurde aufgrund eines tödlichen Verkehrsunfalls angeklagt. Er war seit 13 Jahren Diabetiker. Der Verteidiger vertrat die Ansicht, dass der Angeklagte einen schleichenden hypoglykämischen „Schock“ erlitten hätte. Der Angeklagte wäre 30 Jahre ohne einen Unfall Auto gefahren, daher könne ihm keine sorglose Teilnahme am Straßenverkehr vorgeworfen werden. Dieser Schock wäre durch etwas „Außergewöhnliches“ ausgelöst worden. Das Gericht folgte dieser Meinung und zog nur den Führerschein des Mannes ein.

In der deutschen Rechtsprechung kann unabhängig von den strafrechtlichen Folgen die zivilrechtliche Verantwortlichkeit evaluiert werden (§7 StVB, §823 und 829 BGB).

5.3 Forensische Proben

5.3.1 Glucose und Laktat

Laut der Hypothese nach Traub [167, 258] sind die addierten post mortem Konzentrationen von Glucose und Laktat in der GKF oder in der CSF als erste Indikatoren für ante mortem Glucosekonzentrationen anzusehen. Einige Autoren [264] fragten sich jedoch angesichts der Tatsache, dass Laktatkonzentrationen nach dem Tod in GKF und CSF ansteigen, ob die Summenformel nach Traub dann nicht zu einer Überschätzung der Glucosstoffwechsellentgleisungen mit tödlichem Ausgang führen würde. Daher wurden die Summenformeln in der GKF und in der CSF mit den Glucosekonzentrationen verglichen. Abbildung 42 illustriert die Korrelation zwischen der Glucosekonzentration in der GKF und in der CSF ($R^2 = 0,922$). Das Miteinbeziehen der Laktatkonzentration erniedrigte die Korrelation beider Matrices ($R^2 = 0,815$), was zu der Annahme führt, dass die Glucose-, nicht aber die Laktatkonzentration nahe dem Tod unterschiedlich beeinflusst wird. Auch Palmiere et al. [264] zeigten dies an 470 post mortem Fällen. Fünf der 124 Fälle in

5. Diskussion

unserer Studie zeigen Glucosekonzentrationen post mortem in der GKF > 180 mg/dl. Vier dieser Fälle zeigen auch eine Summenformel nach Traub in der GKF von > 450 mg/dl. Ein Fall wurde nur durch Betrachtung der Glucosekonzentration in der GKF zusätzlich als diabetisches Koma erkannt. Dieser Fall zeigte auch in der CSF eine Glucosekonzentration von 217 mg/dl, eine Summenformel in der CSF aber < 450 mg/dl. Aceton und β -Hydroxybutyrat dieses Falles wiesen allerdings auf eine diabetische Ketoazidose hin, sodass die Glucosekonzentration > 180 mg/dl, nicht aber die niedrige Summenformel der Todesursache entsprachen. Sieben von 76 Verstorbenen wiesen eine Glucosekonzentration > 144 mg/dl in der CSF auf. In diesen 7 Fällen war auch die Summenformel nach Traub in der CSF > 450 mg/dl. Entsprechend dieser Ergebnisse ergibt die Summenformel nach Traub keine zusätzliche Information für die Abschätzung der ante mortem Blutglucosekonzentration. Ein Cut-Off für Glucose in der GKF von 180 mg/dl erscheint verlässlich (Sensitivität 100 %, Spezifität 100 %). Palmiere et al. [271] kamen zum selben Schluss, Karlovsek et al. [251, 259, 269, 270, 366] waren der Meinung, dass Glucosekonzentrationen > 234 mg/dl für ein diabetisches Koma sprächen. Glucosekonzentrationen von nicht-diabetischen Verstorbenen liegen bei 20 mg/dl [80], 30-80 mg/dl [70, 267], 4-60 mg/dl [167], 0-75 mg/dl [268] oder 0-108 mg/dl [258], sodass auch im Vergleich mit anderen Studien ein Cut-Off von 180 mg/dl Glucose eine gute Sensitivität verspricht. Zilg et al. [262] postulierten, dass nach einem anfänglichen Abfall der GKF-Glucosekonzentration in der frühen postmortalen Phase diese konstant bleiben, während Laktatkonzentrationen anstiegen. Der Abfall liegt wahrscheinlich an der zurückgebliebenen metabolischen Aktivität der überlebenden Hyalozyten und der inneren Retinazellen. Anschließend bleiben die Glucosekonzentrationen konstant. Weiterhin kann das Ansteigen der Laktatkonzentrationen auch auf andere Ursachen als den Glucosestoffwechsel zurückzuführen sein. Auch bei unseren Fällen zeigt sich daher, dass die Summenformel nach Traub sich bei ante mortem Hyperglykämien hauptsächlich aus der Glucosekonzentration zusammensetzt. Bei anderen Todesursachen setzt sie sich dann hauptsächlich aus der Laktatkonzentration zusammen, die mit dem postmortem Intervall steigt. Tabelle 30 zeigt die Glucose-, Laktatkonzentration und die Summenformel nach Traub in der GKF und der CSF für alle Fälle mit der Todesursache diabetische Ketoazidose. In keinem der Kontrollfälle wurden hohe Summenformeln nach Traub gefunden, die sich nur aus der Laktatkonzentration

5. Diskussion

zusammensetzten. Daher wird daraus geschlossen, dass die Summenformel aus Glucose und Laktat in der GKF oder CSF keine zusätzliche Information liefert, wenn auf die Glucosekonzentration vor dem Tod geschlossen werden soll. Die Benutzung der Summenformel kann sogar zur Überschätzung der Fälle mit tödlichem diabetischen Koma führen. Die Glucosekonzentration in der GKF und der CSF erscheint als der verlässlichste Marker, um antemortem Blutglucosekonzentrationen abzuschätzen. DeLetter et al. [72] hatten gezeigt, dass das PMI kaum Einfluss auf die Summenformel in der GKF hat.

Beim Blick auf Tabelle 30 fällt auf, dass Glucosekonzentrationen im Urin wenig Aussagekraft zum glykämischen Status eines Verstorbenen haben. Diese korrelieren in diesen Fällen nicht mit den Glucosekonzentrationen in der GKF oder der CSF. Eine hohe Urin-Glucosekonzentration wurde trotzdem nur in Fällen mit diabetischem Koma beobachtet, sodass diese durchaus einen Hinweis auf diese Todesursache geben kann. Umgekehrt ist eine niedrige Glucosekonzentration im Urin aber kein Argument, um ein diabetisches Koma auszuschließen.

Fall	Glucose	Laktat	Traub	Glucose	Laktat	Traub	Glucose	HbA1c	Aceton	OH-
	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mmol/mol]	[mg/l]	butyrat
	GKF	GKF	GKF	CSF	CSF	CSF	Urin	FVB	FVB	FVB
S309/11	1053	315	1210	501	293	648	4202	97,9	25709	41400
V0580/11	203	323	365	217	336	385	0	47	900	4590
S213/12	489	398	688					85,5	3280	24190
S212/12	817	582	1108	321	472	557	2559	87,1	855	6761
S77/12	860	291	1006	524	435	741	261	108,9		
S143/10				524	465	757		88,6	5023	9896
S11/10				216	495	464		74	6132	18540
4930/12				676	249	801	28	47,8	53	300

Tabelle 30: Glucose-, Laktatkonzentration und die Summenformel nach Traub in der GKF und der CSF, HbA1c und Ketonkörper für alle Fälle mit der Todesursache diabetische Ketoazidose.

5.3.2 HbA1c

Die HbA1c-Konzentrationen von 115 Verstorbenen lagen im Mittel bei 49,8 mmol/mol (6,71 %). Nicht-diabetische Verstorbene lagen im Mittel bei 47,8 mmol/mol (6,5 %) und damit höher als der für lebende Nicht-Diabetiker angegebene Referenzbereich (4,4-6,1 %). Diabetische Verstorbene hingegen lagen im Mittel bei 59,9 mmol/mol (7,6 %) und damit niedriger als das Kollektiv der klinischen Diabetespatienten (8,81 %). HbA1c-Konzentrationen bleiben demzufolge also nach dem Tode relativ

5. Diskussion

konstant. Auch Uemura [266] sah den HbA1c als einen der nützlichsten und verlässlichsten Marker post mortem an, weil glykiertes Hämoglobin für mindestens 36 Stunden nach dem Tod stabil und von einer Hämolyse verschont bleibt [72, 176]. HbA1c zeigte wie auch in anderen Studien nur geringe Abweichungen von lebenden Menschen [62]. Die HbA1c-Konzentration wird aber erst nach einer 12 Stunden anhaltenden Hyperglykämie beeinflusst [274], kurze Hyperglykämien sind ohne Auswirkung auf die HbA1c-Konzentration. So lässt der HbA1c zwar keine Rückschlüsse auf die aktuelle Glucosekonzentration vor dem Tod zu, kann aber grundsätzliche Informationen zum glykämischen Status des Diabetes des Verstorbenen in den Wochen vor dessen Tod geben. Bei 7 von 8 Verstorbenen, bei denen die Todesursache „diabetisches Koma“ ermittelt wurde, zeigte sich ein HbA1c im FVB weit über dem Referenzbereich (74-108,9 mmol/mol entspricht 8,9-12,1 %). Nur in einem Fall wurde neben der erhöhten GK-Glucosekonzentration ein HbA1c im nur leicht erhöhten Bereich gefunden (47,8 mmol/mol entspricht 6,5 %). Andere Studien hatten HbA1c-Konzentrationen nach diabetischen Komata mit > 109 mmol/mol (> 12,1 %) beschrieben. Erhöhte HbA1c-Konzentrationen korrelierten bei Kernbach et al. mit der Summenformel nach Traub im Liquor [276, 278]. Abbildung 43 zeigt die Korrelation der HbA1c-Konzentration post mortem mit den Summenformeln in GKF und CSF. Die HbA1c-Konzentration korreliert sowohl mit der Summenformel in der GKF ($R^2 = 0,499$) als auch mit der in der CSF ($R^2 = 0,419$), höhere HbA1c-Konzentrationen korrelieren noch besser. Umgekehrt ist das aber nicht der Fall. Das zeigt, dass derartige Fälle in der Regel nur bei Diabetikern mit schlecht eingestelltem Diabetes auftreten. Es wäre schwer, für ein hyperglykämisches Koma zu plädieren, wenn eine HbA1c-Konzentration im Normalbereich oder gar darunter, wie sie bei periodisch auftretenden Hypoglykämien vorkommen, gemessen werden würde. Weiterhin ist die Bestimmung des HbA1c post mortem in Fällen nützlich, wenn die Todesursache ein nicht diagnostizierter Diabetes mellitus war, um zwischen einem diabetischen und einem nicht-diabetischen Verstorbenen zu unterscheiden. So traten auch einige extrem hohe HbA1c-Konzentrationen bei Verstorbenen auf, in deren Unterlagen keine Diabeteserkrankung festgehalten war. In diesen Fällen konnte dadurch ein unbekannter oder nicht dokumentierter Diabetes mellitus erkannt werden. Falls die Ketonkörper erhöht sind, kann ein erhöhter HbA1c helfen, zwischen einer

5. Diskussion

diabetischen Ketoazidose und anderen Ursachen (Verhungern, Alkohol) zu unterscheiden.

5.3.3 Fructosamin

Ähnlich wie die HbA1c-Konzentration stellt Fructosamin ein Langzeitglucosegedächtnis der letzten Wochen dar. Mit Fructosamin sind alle glykierten Proteine gemeint, die einen Hinweis auf die Glucosekonzentrationen der letzten 1-3 Wochen geben und daher direkt mit den ante mortem Glucosekonzentrationen im Serum korrelieren [70, 72, 267, 268]. Dies zeigt sich auch an unserem klinischen Kollektiv an einer nur schwachen Korrelation mit der aktuellen Glucosekonzentration und einer starken signifikanten Korrelation mit HbA1c. Im post mortem gefällten Blut zeigten sich durchaus Unterschiede zwischen Diabetikern (MW 138 $\mu\text{mol/l}$; 12,3-513 $\mu\text{mol/l}$; n = 19) und Nicht-Diabetikern (MW 78,4 $\mu\text{mol/l}$; 11,6-286 $\mu\text{mol/l}$; n = 81). Im Vergleich zu einer früheren Studie, in denen Konzentrationen für Nicht-Diabetiker post mortem von $325,3 \pm 147,1 \mu\text{mol/l}$ und für Diabetiker von 1500 $\mu\text{mol/l}$ (MW) gemessen wurden [267], waren die gemessenen Serumkonzentrationen aber erheblich niedriger. Damit zeigten Diabetiker auch im Vergleich zum klinischen Kollektiv stark erniedrigte Fructosaminkonzentrationen (klinisches diabetisches Kollektiv 181-696 $\mu\text{mol/l}$; MW 346 $\mu\text{mol/l}$). Auch die Nicht-Diabetiker zeigten deutlich erniedrigte Fructosamin-Serumkonzentrationen als die beschriebenen Referenzkonzentrationen (205-285 $\mu\text{mol/l}$). Somit lässt sich zwar bei hoher Fructosamin-Serumkonzentration post mortem ein ante mortem undiagnostizierter Diabetes bestätigen, aber keine Rückschlüsse auf die Glucosekonzentration vor dem Tod tätigen. Fructosamin-Konzentrationen von $> 300 \mu\text{mol/l}$ im Serum, $> 100 \mu\text{mol/l}$ in der GKF und $> 150 \mu\text{mol/l}$ in der CSF wurden nur bei bekannten Diabetikern ermittelt (Abbildung 39) und geben daher post mortem einen Hinweis auf einen nicht dokumentierten Diabetes. Fructosamin-Serumkonzentrationen von 4 der 8 in Tabelle 30 dargestellten Fälle eines Todes durch diabetisches Koma lagen bei 51 $\mu\text{mol/l}$, 110 $\mu\text{mol/l}$, 129 $\mu\text{mol/l}$ und 512 $\mu\text{mol/l}$ und lassen daher alleine keine Aussage über den akuten glykämischen Status vor dem Tod zu.

In der GKF und der CSF zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Fructosamin-Konzentrationen zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern. Werte $> 100 \mu\text{mol/l}$ in der GKF und $> 150 \mu\text{mol/l}$ in der CSF wurden allerdings nur bei

5. Diskussion

bekanntem Diabetikern ermittelt. Dies widerspricht einigen Studien, bei denen GKF-Fructosaminkonzentrationen im Mittel bei 500 $\mu\text{mol/l}$ lagen. Osuna et al. [267] beschrieben bei 92 Verstorbenen ebenfalls viel höhere Konzentrationen in der GKF als in unserer Studie (MW 48,1 $\mu\text{mol/l}$; 0-448 $\mu\text{mol/l}$). Diabetiker (MW 1500 $\mu\text{mol/l}$; 0-5900 $\mu\text{mol/l}$; n = 49) zeigten bei Osuna et al. [367] signifikant ($p < 0,0001$) höhere Konzentrationen als Nicht-Diabetiker (MW 500 $\mu\text{mol/l}$; 0 - 3500 $\mu\text{mol/l}$; n = 43). In einer weiteren Studie von Osuna et al. [367] beschrieben diese dann Konzentrationen von 880 $\mu\text{mol/l}$ bei Diabetikern (n = 111) und 160 $\mu\text{mol/l}$ (n = 342) in der GKF post mortem. Das Verhältnis der Fructosamin-Konzentration in der GKF und das Verhältnis der Mikroproteine war ebenfalls signifikant ($p = 0,021$) unterschiedlich [367]. Die höchsten Konzentrationen wurden auch in unserer Studie in der GKF bei bereits diagnostizierten Diabetikern ermittelt. Doch auch in der GKF lässt sich bei hoher Fructosamin-Konzentration kein Rückschluss auf die Glucosekonzentration vor dem Tod tätigen. Fructosamin-GKF-Konzentrationen von 4 der 8 in Tabelle 30 dargestellten Fälle eines Todes durch diabetisches Koma lagen bei 0 $\mu\text{mol/l}$, 77,2 $\mu\text{mol/l}$, 222 und 333 $\mu\text{mol/l}$. Das PMI hatte keinen Einfluss [368] auf die Fructosaminkonzentrationen.

5.3.4 Der Nachweis von humanem und synthetischen Insulinen

Bei forensischen Fällen zeigte sich zunächst ein Matrixproblem. Weiterhin zeigt sich, dass die Schwierigkeit der Insulinanalytik post mortem nicht nur in der Qualifizierung und Quantifizierung selbst, sondern auch in der Interpretation der Analyseergebnisse besteht. In der Literatur sind nur wenige Fälle beschrieben.

Postmortale Blutproben weisen meistens eine Hämolyse auf. Das zähe FVB lässt sich zwar noch zentrifugieren, um Hämolysat zu entfernen. Durch Zentrifugation lässt sich jedoch kein Serum post mortem gewinnen. Blut hat jedoch den Nachteil der bekannten Instabilität von Insulin post mortem. Diese wurde in einer Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin in Frankfurt untersucht [368]. Es zeigte sich, dass bei einer Inkubation von Insulin mit Serum oder mit intakten Blutzellen keine Abnahme der Insulinkonzentration eintritt. Daher kann, wie auch bei unseren Stabilitätsuntersuchungen bestätigt, für die Insulinbestimmung Serum als Untersuchungsmaterial empfohlen werden. Bei Inkubation des Insulins mit hämolysiertem Blut zeigte sich dagegen, dass die Insulinkonzentration schon

5. Diskussion

innerhalb von 5 h bei 37°C signifikant auf 20% der Ausgangskonzentration sank. Ein proteolytischer Insulinabbau konnte ausgeschlossen werden, da der Zusatz von Enzyminhibitoren keine Hemmung des Insulinabbaus bewirkte. Nach weiteren Versuchen wurde der Abbau des Insulins post mortem auf den Austritt von Hämoglobin aus den Erythrozyten zurückgeführt. Dabei führte nur die Inkubation von Insulin mit den isolierten Globinketten zu einem Insulinabbau. Von der Globinkette ist mindestens eine Thiolgruppe der Hämoglobin-Betakette für den Abbau verantwortlich [178, 368, 369]. Unsere Untersuchungen an post mortem Femoralvenen- und Herzblut bestätigten diese Untersuchungen. In keinem Fall konnte humanes Insulin in diesen Matrices nachgewiesen werden. Leider lässt sich auch über die Stabilität von synthetischen Insulinen post mortem keine Aussage treffen, da für diese Aussagen Realfälle vorliegen müssen.

Die Überlebenszeit nach einer Insulininjektion hängt von vielen Faktoren ab: Insulintyp (und dadurch Wirkbeginn und Halbwertszeit), Administrationsweg (Injektion, Infusionspumpe) oder Ort der Injektion. Die Überlebenszeit und das post mortem Intervall beeinflussen sicherlich die gemessene Insulinkonzentration, da Insulin im Blut bei Kontakt mit Hämoglobin und bei Körpertemperatur enorm schnell abgebaut wird [368]. Leider ist in der forensischen Praxis diese Zeit meist unbekannt, da Leichen erst eine längere Zeit nach dem Todseintritt gefunden werden. Die Abläufe des Insulinabbaus ante- und post mortem, der Verteilung und des Insulintransports über die Blut-Glaskörperbarriere oder in andere Organe sollte Anlass weiterer Forschung sein. Die Insulinbestimmung in post mortem Blut hat aufgrund der ablaufenden thanatochemischen Prozesse, vorwiegend Hämolyse, wenig diagnostischen Wert.

Daher muss auf andere post mortem Matrices ausgewichen werden. Wie unser Fallbeispiel belegt, ist es durchaus möglich, eine Insulinzufuhr in post mortem Matrices nachzuweisen. Die beste Möglichkeit bei Verdacht auf eine Insulinzufuhr liefert dabei die Injektionsstelle. Diese muss bei einer Obduktion vorsichtig und großflächig ausgeschnitten werden und kann anschließend nach Extraktion mit Methanol oder einer wässrigen Natriumchlorid-Lösung (7 %) mit der beschriebenen Immunoaffinitätsaufreinigung mittels magnetischer beads für die LC-MS-Analyse vorbereitet werden. Ähnlich ist es mit dem umgebenden Muskelgewebe. Auch in

5. Diskussion

Nierengewebe konnte Humalog nachgewiesen werden. Wunder et al. [370] hatten allerdings postuliert, dass Leber- und Nierengewebe nicht geeignet erscheinen, da bei Inkubationen eine erhebliche Insulinabnahme festgestellt werden konnte. Die Extraktion verlief mit Methanol (808 $\mu\text{U/g}$ in der Injektionsstelle) mit einer höheren Extraktionsausbeute als mit Natriumchlorid-Lösung (581 $\mu\text{U/g}$ in der Injektionsstelle), daher kann die (Prä)Extraktion mit Methanol empfohlen werden.

Eine weitere wichtige post mortem Matrix ist die GKF. Die GKF ist ein wertvolles Material für chemisch-toxikologische Analysen und während der Obduktion leicht zu gewinnen. Der Vorteil dieser Matrix liegt in seiner anatomischen Isolation, so ist sie besonders nützlich in Fällen von fortgeschrittener Autolyse und Fäulnis. Für GKF zeigten Coe et al., dass humanes Insulin kaum die Blut-GKF-Barriere durchdringt. Ein in der Literatur beschriebener Fall [371] ist insofern interessant, da in diesem Fall ante mortem Blutproben vorliegen. Eine solche Situation ist in forensischen Routinefällen nicht üblich. Der Fall beschreibt die Analyse von Glaskörpermaterial im Falle einer Insulinüberdosis, die in ante mortem Blutproben (humanes Insulin $> 5000 \mu\text{U/ml}$) bestätigt werden konnte. In diesem Fall lieferte post mortem Blut kein Ergebnis, sodass auf den Glaskörper ausgewichen wurde, in dem humanes Insulin in einer Konzentration von 28,8 $\mu\text{U/ml}$ aufgefunden wurde. Laut Literatur [372] wird immunoreaktives Insulin in der GKF von nicht-diabetischen Ratten im Mittel in Konzentrationen von 0,15 $\mu\text{U/ml}$ aufgefunden, in etwa 100fach geringer als in den entsprechenden Serumkonzentrationen. Angesichts der Beobachtung, dass die Diffusion von Analyten zwischen der Blut-Okular-Barriere konzentrationsabhängig ist und die Blutkonzentrationen bei Nicht-Diabetikern zwischen 5 und 30 $\mu\text{U/ml}$ schwankt, wurden noch viel geringere Konzentrationen in der GKF erwartet.

In 10 nicht-diabetischen Kontroll-GKF fand sich daher bei Thevis et al. [373] kein humanes Insulin. Auch bei unseren 46 Kontrollfällen post mortem fand sich im Glaskörper kein humanes Insulin. Nowicka et al. [372] analysierten 93 Glaskörperflüssigkeiten mittels Radioimmunoassay, wovon in 86 Fällen kein Insulin nachweisbar war. Nur in 7 Fällen konnte Insulin bestimmt werden (1,42-24,4 $\mu\text{U/ml}$). Besonders im Falle der höchsten Insulinkonzentration (24,4 $\mu\text{U/ml}$) konnte die Insulinkonzentration und die Anwesenheit einer Insulinspritze neben dem Leichnam auf eine Insulinintoxikation hinweisen.

5. Diskussion

Daher ist die Entnahme der Glaskörperflüssigkeit bei einer Obduktion unablässig, wenn Verdacht auf eine Insulinintoxikation besteht. Das synthetische Insulinanalogon Humalog konnte auch von uns in einem authentischen Fall in dieser Matrix in relativ hoher Konzentration (103 $\mu\text{U/ml}$) nachgewiesen werden. In einem weiteren Fall wurde eine Insulinintoxikation durch die Messung in der GKF mittels Immunoassay nachgewiesen, in dem eine Humaninsulinkonzentration von 31 $\mu\text{U/ml}$ gemessen wurde. Insulin im Blut war auch hier nicht detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass humanes Insulin nur bei exogener Gabe im Glaskörper nachzuweisen ist [374]. In einem weiteren in der Literatur beschriebenen Fall konnte auch in Galle eine Insulinintoxikation bestätigt werden [375]. Für die Praxis wird, wenn möglich, eine Insulinbestimmung aus Serum empfohlen, am besten in ante mortem Material von Verstorbenen. Weiterhin können die Injektionsstelle und weitere Organe und die GKF extrahiert werden. Weiterer Forschungsbedarf besteht für die Untersuchung der Insulinstabilität in realen postmortalen Blutproben.

Auch der qualitative Nachweis von humanem oder synthetischen Insulinen im Urin ist möglich. Insulin wird ganz normal im Glomerulus der Niere filtriert, wird aber nahezu komplett rückresorbiert [376]. Daher kommt nur eine geringe und sehr variable Fraktion des Insulins im Blutstrom in den Urin. Schon geringe Nierenfehlfunktion kann die Reabsorption beeinträchtigen und eine größere Fraktion des Insulins erreicht den Urin. Die Niere ist das Organ, in dem Insulin am meisten verstoffwechselt wird, daher erreicht nur weniger als 1 % des Insulins den Urin intakt. Humaninsulin wird [377] – wie auch die synthetischen Insulinanaloge Lantus[®] und Levemir[®], die ebenfalls nicht intakt in Urinproben aufgefunden werden können [378] – erheblich metabolisiert. Die Enzyme “insulin-degrading enzyme” (IDE) und “endosomal-acidic insulinase” (EAI) wurden als die Hauptenzyme identifiziert [378]. Einige Stellen des Moleküls in unterschiedlichen A- und B-Kettenpositionen, an denen Teilungen mittels IDE vonstatten gehen, wurden beschrieben: A13/14, A14/15, B9/10, B10/11, B13/14, B16/17, B24/25, B25/26 [194]. Thomas et al. [194] entdeckten nur einen dieser Metabolite in humanem Urin (desB25-30), fügten allerdings neue Metaboliten hinzu (DesB24-30, DesB25-30, DesB32-30, DesB30). Für Lantus[®] wurden desB30-32, desB31-32 und desB24-32 als Metaboliten identifiziert. Der Hauptmetabolismus von Levemir[®] beinhaltet eine Deacylierung des Myristinsäurerests, was zu dem Metaboliten desB30 Humaninsulin führt [48]. Nur in

5. Diskussion

einem Insulin-Mordfall wurde das Urteil durch die Messung der Humaninsulinkonzentration im Urin gestützt [48]. Ansonsten ist aber eine quantitative Aussage in Urin nicht aussagekräftig genug.

5.3.5 Methylglyoxal

Die steigenden MG Konzentrationen nach dem Tod (von Konzentrationen wie im Lebenden bis zu 1300 ng/ml 8 Tage nach der Obduktion) sind nicht auf den Glucosemetabolismus zurückzuführen, sondern entstehen wahrscheinlich aus anderen Stoffwechselwegen und mikrobieller Aktivität. Besonders könnte der Aminosäuremetabolismus mit der Zwischenstufe MG eine Rolle spielen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass MG in vitro aus seiner irreversiblen proteingebundenen Form in die reversible oder freie Form freigesetzt wird, was zur hohen Gesamt-MG-Konzentration beitragen könnte. Aufgrund der Tatsache, dass sich die MG-Konzentrationen nach dem Tod in einer unvorhersehbaren Weise verändern und dass keine Korrelation zur Summenformel nach Traub besteht, lässt sich sagen, dass MG kein nützlicher glykämischer Marker post mortem darstellt.

5.3.6 Anhydroglucitol

AG besitzt auch post mortem den großen Vorteil der metabolischen Stabilität. Nach dem Tod kann es in etwa denselben Konzentrationen wie im Lebenden detektiert werden. Die AG-Konzentrationen waren jedoch niedriger als vor dem Tod. Die mittleren AG Konzentrationen bei lebenden Nicht-Diabetikern lagen bei 23,3 µg/ml, bei verstorbenen Nicht-Diabetikern bei 15,5 µg/ml ($p < 0,0001$). Die mittleren AG-Konzentrationen bei lebenden Diabetikern lagen bei 5,74 µg/ml, bei verstorbenen Diabetikern bei 4,74 µg/ml ($p < 0,0001$). Der Grund für diese Beobachtung liegt auch in der unterschiedlichen gemessenen Probenmatrix: in postmortem Fällen wurde Vollblut verwendet, in ante mortem Fällen Serum. Das Vollblut/Serum-Verhältnis wurde in unserer Studie mit 0,8 gemessen, das bedeutet, dass die Konzentrationen im Serum grundsätzlich höher sind als im Vollblut.

In Toten waren die mittleren AG Konzentrationen im FVB bei Nicht-Diabetikern ebenfalls signifikant höher als bei Diabetikern. Somit ist zumindest eine Aussage über die Diabeteserkrankung möglich. Ein Cut-Off von > 10 µg/ml für einen gut eingestellten Glucosehaushalt, wie er im Lebenden vorgeschlagen wurde, kann auch post mortem gelten. Nur 14 der 71 Diabetiker wiesen post mortem eine Konzentration > 10 µg/ml auf, im Gegensatz dazu zeigten 24 von 88 Nicht-

5. Diskussion

Diabetikern Konzentrationen $< 10 \mu\text{g/ml}$. Die Konzentrationen überlappen sich also zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Nur im Falle einer sehr niedrigen AG Konzentration kann ein Diabetes, der vor dem Tod nicht bekannt war, aufgrund der AG-Analytik aufgedeckt werden. Ein Diabetes kann aber aufgrund eines AG-Konzentration $> 10 \mu\text{g/ml}$ nicht ausgeschlossen werden.

Bei 5 Fällen mit Todesursache „diabetisches Koma“ waren die AG-Konzentrationen immer $< 10 \mu\text{g/ml}$ und extrem niedrig. Die Konzentrationen unterscheiden sich zwar nicht signifikant von diabetischen Verstorbenen mit einer Summenformel im Normbereich, eine deutliche Korrelation zwischen der AG-Konzentration und der Summenformel nach Traub war nicht gegeben, die maximale Konzentration der Verstorbenen mit diabetischem Koma lag aber bei $3,15 \mu\text{g/ml}$. AG kann als Alternative zur Messung des HbA1c oder Fructosamin angesehen werden, um abzusichern, ob der Verstorbene Diabetiker war und der Diabetes schlecht kontrolliert war. Im Falle eines diabetischen Kommas werden sehr niedrige AG-Konzentrationen beobachtet.

5.3.7 Hypoglykämien post mortem

Der Nachweis einer todesursächlichen Hypoglykämie fällt sehr schwer. Erste Hinweise für eine Überdosis mit Insulin oder oralen Antidiabetika kann aus der Beziehung der toten Person / des Täters zu bestimmten Berufsgruppen, z.B. Ärzten, Apothekern, Krankenschwestern etc. geschlossen werden, da diese Gruppen häufig in Zusammenhang mit Insulinmorden standen. Insulinvials, Spritzen, Nadeln oder Arzneimittelblister in der Nähe der aufgefundenen Person können weitere Hinweise geben [54, 379]. Während der Obduktion gibt es kaum pathomorphologische Befunde, die direkt auf eine Überdosis mit Insulin oder oralen Antidiabetika hindeuten können. Weniger bekannte Nebenwirkungen einer zu hohen Dosis Insulin sollten in Erwägung gezogen werden: Hypokalämie, Hypophosphatämie, Hypomagnesiämie [55], akute Fettleber [56] oder Lungenödem [271].

Zunächst gestaltet sich der Nachweis der Hypoglykämie selbst über die Summenformel nach Traub als schwierig. Es wurden Grenzwerte von $< 160 \text{ mg/dl}$ [256] bzw. $< 100 \text{ mg/dl}$ [262] in der Literatur beschrieben. Bei Anlegung dieser Cut-Offs würden aber auch 14 der hier beschriebenen Kontrollfälle post mortem unter Hypoglykämien gelitten haben. De Letter et al. [105] beschrieben den Cut-Off für die Summenformel nach Traub für den Nachweis einer Hypoglykämie mit 25

5. Diskussion

mg/dl. Ein extrem geringer HbA1c bei behandelten Diabetikern spricht weiterhin für periodisch auftretende hypoglykämische Episoden.

Neben dem Nachweis einer Hypoglykämie sollte auch die Ursache dieser gelingen. Intrinsische Ursachen einer Hypoglykämie, insbesondere ein Insulinom, sollten während der Obduktion ausgeschlossen werden. Bei der Obduktion sollten neben den gängigen Materialien FVB und Urin auch die GKF entnommen werden. Für die Praxis wird, wenn möglich, eine Insulinbestimmung aus Serum empfohlen, am besten in ante mortem Material von Verstorbenen. Weiterhin können die Injektionsstelle und weitere Organe extrahiert werden. Weiterer Forschungsbedarf besteht für die Untersuchung der Insulinstabilität in realen postmortalen Blutproben. Weiterhin sollte chromatographisch die Einnahme von oralen Antidiabetika ausgeschlossen werden. Die Detektion der Injektion von synthetischen Insulinanaloga stellt mit der beschriebenen Methodik zumindest im Serum kein Problem dar. Im Falle des Verdachts auf eine Injektion mit humanem Insulin muss auch die Analytik auf das C-Peptid erfolgen. Nüchtern-Insulinkonzentrationen $> 500 \text{ pmol/l}$ sollten den Verdacht auf eine Insulininjektion lenken, die zusätzliche C-Peptid-Analytik ist aber unerlässlich. Wurde kein humanes Insulin injiziert, treten bei hypoglykämischen Patienten in unserem Patientenkollektiv extrem niedrige Insulinkonzentrationen auf, $< 29,8 \text{ pmol/l}$ ($< 4,14 \text{ } \mu\text{U/ml}$) [106] bzw. $< 35,8 \text{ pmol/l}$ ($< 4,97 \text{ } \mu\text{U/ml}$) [45] bzw. $< \text{LoQ}$. Eine niedrige C-Peptid-Konzentration alleine ist dann zwar ein Hinweis auf eine exogene Gabe von Insulin, besitzt aber nur in Relation zur Insulinkonzentration Aussagekraft und darf nie alleiniges Kriterium sein. Ein Verhältnis Insulin zu C-Peptid $> 0,22$ im nüchternen Zustand in den der Injektion folgenden 180 min spricht sehr für die Injektion von Insulin. I:C kann aber nur richtig interpretiert werden, wenn sowohl die Blutglucosekonzentration als auch die absoluten Konzentrationen der beiden Peptide mit zu Rate gezogen werden.

Die Pharmakokinetik in Situationen einer Insulinüberdosierung ist von Bedeutung. Die Kinetik von exogenem Insulin wird durch eine große intra- und interindividuelle Variabilität charakterisiert [44]. Es gibt folgenden Unterschied zwischen endogenem und exogenem Insulin: Das endogene Hormon kommt zunächst über den Leberpfortaderkreislauf in die Leber, welche einen überproportionalen Anteil der Insulinfraction im Vergleich zu anderen Geweben aufnimmt. Nach parenteraler Aufnahme von Insulin erhält die Leber nur eine kleine Fraktion. Die Resorptionsrate

5. Diskussion

von Insulin hängt von mehreren Faktoren ab: der Injektionsort spielt eine Rolle, die Resorptionsrate steigt in der Reihenfolge Bein, Gesäß, Arm, Bauch. Von Mach et al. [80] zeigten, dass in der Mehrzahl der Überdosen das Insulin subkutan injiziert wurde. Injektionstechnik, Insulinkonzentration und -typ, die Konzentration an Glucose und gegenregulierenden Hormonen, nüchtern- oder postprandialer Status des Patienten haben ebenfalls einen enormen Einfluss [25]. Während einer Insulinüberdosis verläuft die Kinetik des exogenen Insulins nach erster Ordnung und tritt als lineare Abnahme in einer halblogarithmischen Skala auf [380]. In einem Nichtkompartimentenmodell zeigten Shibutani und Ogawa [381] bei einem Typ 1-Diabetiker eine Eliminationshalbwertszeit von 6,2 h. Bei einem weiteren Typ 1-Diabetiker, der mit Insulin vergiftet wurde, zeigte Fasching [2, 3] einen zweiphasigen langsamen Abfall mit Halbwertszeiten von 4 h und 10 h für die aufeinanderfolgenden Schritte.

5.3.8 Hyperglykämien post mortem

Diabetes wird gleichermaßen selten in Todesscheinen [50] als Krankheit (es kann mit weiteren 8% Menschen mit unentdecktem Diabetes mellitus gerechnet werden) und Todesursache festgehalten. Daher stehen in dieser Diskussion zwei mögliche Fragestellungen im Vordergrund: 1. Litt der Verstorbene unter einem nicht bekannten Diabetes mellitus? und 2. War dieser im Sinne eines diabetischen Komats todesursächlich?

Die Frage nach einem Diabetes kann zunächst durch eine gezielte Anamnese der Patientenunterlagen geklärt werden. Ist ein Diabetes nicht bekannt, kann die Obduktion Hinweise geben. Diese zeigt bei diabetischen Verstorbenen häufig fettige Veränderungen der Niere mit gelb-roter Eintrübung des Nierenparenchyms, eine diabetische Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson (Abbildung 46) oder eine Leberverfettung [53]. Ein gelbfarbenedes Cranium gibt einen Hinweis auf einen Diabetes. Weiterhin können biochemische Messungen Hinweise geben: ein HbA1c > 6,5 %, Fructosamin im Serum > 300 µmol/l im Serum, > 100 µmol/l in der GKF und > 150 µmol/l in der CSF, AG < 10 µg/ml im FVB geben klare Hinweise auf eine anhaltende Hyperglykämie in den Wochen vor dem Tod. Umgekehrt schließen aber andere Ergebnisse bzgl. dieser Parameter einen Diabetes nicht aus.

Auch bei der Frage nach einem diabetischen Koma kann zunächst eine gezielte Anamnese helfen, wenn die Situation vor dem Tode vom Arzt oder Beteiligten

5. Diskussion

beschrieben werden kann. Vor dem Tod sind bei Patienten mit anschließendem hyperglykämischem Koma meist Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Erbrechen, Bauchschmerzen, Schwächegefühl und Benommenheit zu beobachten. Vor allem die Kussmaul-Atmung (schnelles und tiefes Ausatmen mit Aceton-Geruch) ist leicht zu erkennen und gibt später einen Hinweis auf die Todesursache. Eine histologische Untersuchung sollte unbedingt angeschlossen werden, eine Glykogen-Nephrose mit sogenannten Armanni-Ebstein Zellen in der Niere ist sehr spezifisch für eine langanhaltende Hyperglykämie > 500 mg/dl [262]. Abbildung 46 zeigt allgemeine histologische Befunde der in Kapitel 6.3.9 beschriebenen Fälle, bei denen als Todesursache eine hyperglykämische Stoffwechsellage ermittelt wurde.

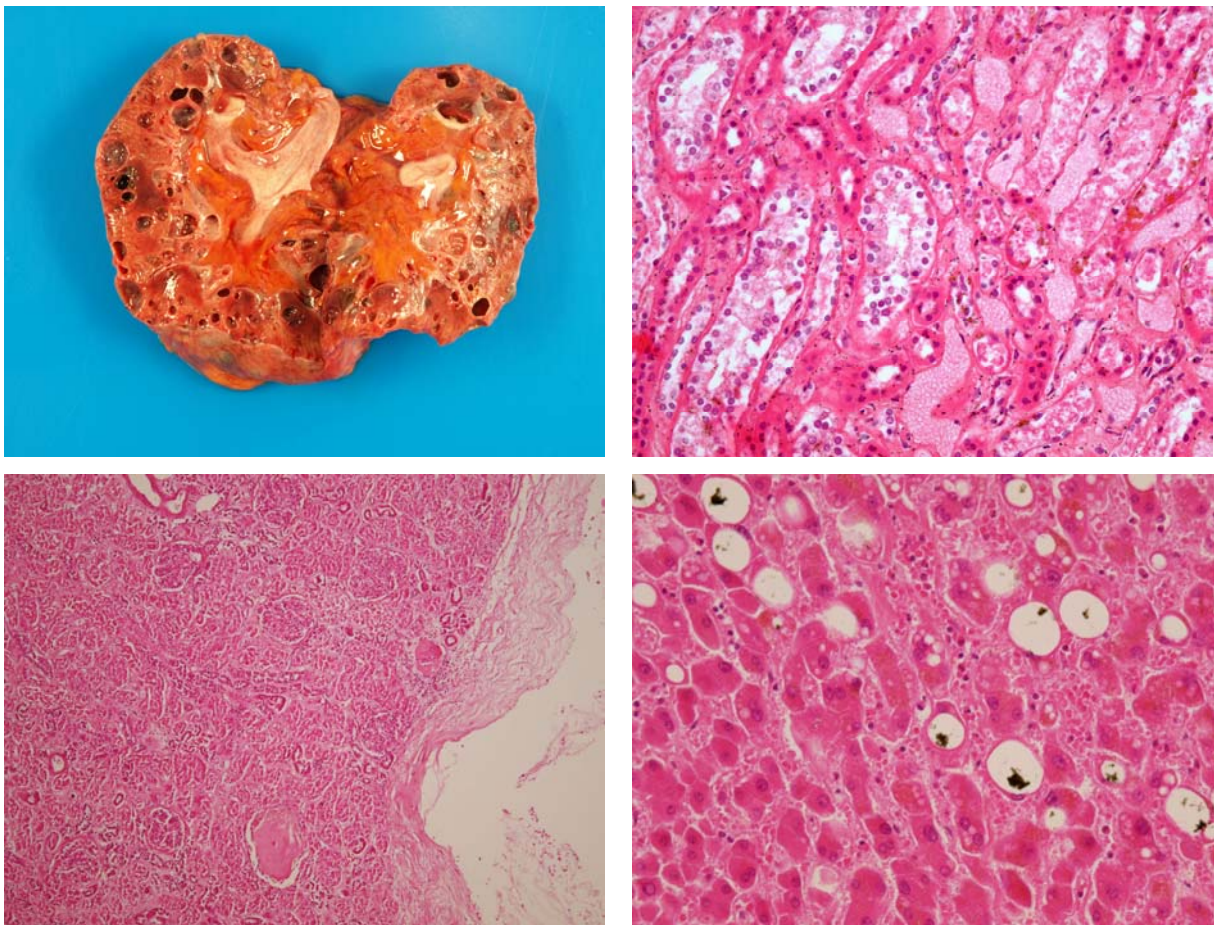


Abbildung 46: Typische pathomorphologische Auffälligkeiten post mortem bei den aufgeführten Fällen mit diabetischem Koma: links oben eine geschrumpfte Niere eines Diabetikers; rechts oben Armanni-Ebstein-Zellen in der Niere (x 400); links unten diabetische Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson (x 100); rechts unten Glykogenablagerung in einer diabetischen Leber

Zur chemisch-toxikologischen Untersuchung müssen auf jeden Fall bei der Obduktion GKF, CSF, FVB und bedarfsweise auch Urin entnommen werden. Eine

5. Diskussion

Glucosekonzentration in der GKF > 180 mg/dl ist der verlässlichste Hinweis auf eine diabetische Stoffwechsellage. Zusätzlich kann die Messung von Laktat in der GKF und der CSF und damit die Summenformel > 450 mg/dl in diesen Matrices ergänzend auf ein diabetisches Koma hindeuten. Es muss allerdings auch auf die Geschichte des Falles geachtet werden, denn Fälle mit intensiver Reanimation vor dem Tod oder längerem Todeskampf wiesen ebenfalls Summenformeln in der GKF > 430 mg/dl auf [382].

Eine hohe Urin-Glucosekonzentration wird nur in Fällen mit diabetischem Koma beobachtet, sodass diese durchaus einen Hinweis auf diese Todesursache geben kann. Umgekehrt ist eine niedrige Glucosekonzentration im Urin aber kein Argument, um ein diabetisches Koma auszuschließen. Erhöhte HbA1c-Konzentrationen korrelieren mit der Summenformel nach Traub. In der Regel stirbt ein Diabetiker bei schlecht eingestelltem Diabetes daran. Es wäre schwer für ein hyperglykämisches Koma zu plädieren, wenn eine HbA1c-Konzentration im Normalbereich oder gar darunter, wie sie bei periodisch auftretenden Hypoglykämien vorkommen, gemessen werden würde. Falls die Ketonkörper erhöht sind, kann ein erhöhter HbA1c zwischen einer diabetischen Ketoazidose und anderen Ursachen (Verhungern, Alkohol) unterscheiden. Stark erniedrigte (< 5 µg/ml) AG-Konzentrationen weisen ebenfalls auf hyperglykämische Episoden in den Tagen vor dem Tod hin.

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Parametern ist die Messung von Ketonkörpern bei Verdacht auf eine diabetische Stoffwechsellage unumgänglich. Die in dieser Arbeit beschriebenen Fälle lagen zwischen 53 und 25709 mg/l. Acetoacetat-Konzentrationen bei diabetischer Ketoazidose lagen bei 1500-5400 µmol/l [383], in unseren Fällen bei 215-18780 µmol/l. Eine β-Hydroxybutyrat-Konzentration > 3800 µmol/l spricht für eine Ketoazidose [80], in diesen Fällen wurden β-Hydroxybutyrat-Konzentrationen im FVB von > 600 µmol/l [168], 5600-11300 µmol/l [384-387] oder 4000-12000 µmol/l [168] beschrieben. Bei den hier beschriebenen Fällen lagen die Werte bei 300- 41400 µmol/l. Auch während Hypoglykämien wurden β-Hydroxybutyrat- Konzentrationen von > 600 µmol/l beobachtet [388]. Bei tödlichen alkoholischen Ketoazidosen wurden ebenfalls Konzentrationen zwischen 3000 und 47000 µmol/l beschrieben.

5. Diskussion

5.3.9 Anwendungsbeispiele Hyperglykämie

5.3.9.1 S 309/11

Vorgeschichte: Am 01.11.2011 gegen 2 Uhr nachts sei der Verstorbene Herr S. (66 Jahre) durch einen Nachbarn auf der Straße gesehen worden. Herr S. sei nur mit einem Hemd und Unterhose bekleidet gewesen. Gegen 2:30 Uhr habe die Ehefrau Herrn S. wieder in die eigene Wohnung gelassen, in der Zwischenzeit habe er ein Glas Cola getrunken. Am Morgen nach diesem Vorfall habe Frau S. die Küche gegen 8 Uhr betreten, ihr Mann habe auf einem Stuhl gesessen und etwas Unverständliches gemurmelt. Die Wohnungstür habe offen gestanden, er sei weiterhin nur mit einem Hemd und einer Unterhose bekleidet gewesen. Herr S. habe aufstehen wollen, sei aber zu Boden gefallen. Auf dem Boden liegend sei Herr S. nicht mehr ansprechbar gewesen und habe schwer geatmet. Die Ehefrau habe den Rettungsdienst nicht gerufen. Erst als der Sohn angerufen wurde und die Stiefmutter ihm vom Zustand des Vaters berichtete, habe der Sohn den Rettungsdienst verständigt. Die Ehefrau des Verstorbenen habe bei Eintreffen der Polizei einen alkoholisierten, wirren Eindruck gemacht. Sie habe keinen schlüssigen Grund für das Nicht-Informieren des Rettungsdienstes gegeben. Laut Ehefrau habe Herr S. unter schweren Lungenbeschwerden und Diabetes gelitten, die Medikamente habe er nur unregelmäßig genommen, teils verweigert. In den 7 Tagen vor dem Tod habe er Essen und Medikamente verweigert. Der Sohn habe in seiner Vernehmung die Vermutung geäußert, dass die Stiefmutter den Vater vergiftet habe, belegen konnte er dies aber nicht.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 03.11.2011, das post mortem Intervall betrug 2 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: blasse Schleimhäute und Organe; teils trockenes Gewebe; gelbes Schädeldach; mäßige und nicht stenosierende Koronarsklerose; konzentrische Zunahme der Herzkammerwandstärke links und rechts; chronische Lungenüberblähung bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) mit Zwerchfellschnürfurchen; ausgeprägte Aorten- und Arteriosklerose; Hirnödem und Frontalhirnatrophie.

Toxikologische und biochemische Befunde:

- Blut: Carbamazepin 309 ng/ml und dessen Metabolit 10,11-Carbamazepin-epoxid 52 ng/ml (therapeutische Konzentration von Carbamazepin: 2 - 8 µg/ml)

5. Diskussion

- Glucose im FVB: 926 mg/dl
- Glucose in der GKF: 1052,6 mg/dl, Laktat in der GKF: 314,8 mg/dl, Summenformel nach Traub in der GKF: 1210 mg/dl
- Glucose in der CSF: 501,2 mg/dl, Laktat in der GKF: 293 mg/dl, Summenformel nach Traub in der CSF: 647,7 mg/dl
- Glucose im Urin: 4202 mg/dl
- HbA1c im FVB: 97,9 mmol/mol
- Fructosamin im FVB: 512,7 µmol/l
- Anhydroglucitol im FVB: 1,02 µg/ml
- Aceton im FVB 25709 mg/l, Acetoacetat im FVB 18980 µmol/l, β-Hydroxybutyrat im FVB 41400 µmol/l

5.3.9.2 S 77/12

Vorgeschichte: Herr A. (41 Jahre) sei am 08.03.2012 leblos auf der Beifahrerseite im Führerhaus des Lkw einer Speditionsfirma auf einem Parkplatz an einer Bundesstraße, den Kopf an die Beifahrertür angelehnt aufgefunden worden. Er sei Typ 1- Diabetiker gewesen und habe unregelmäßig Insulin gespritzt. Die Jeanshose sei bis auf die Oberschenkel herabgelassen gewesen.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 12.03.2012, das PMI betrug 4 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: Teerstuhl im Dünndarm; längs gestellte Schleimhautrisse des Ösophagus am Mageneingang bei venöser Gefäßzeichnung des Ösophagus; kaffeersatzartiger Inhalt im Magen; Aspiration von Magensaft bis in die mittleren Bronchien mit akuter Überblähung der Lungen; Blutfülle der inneren Organe; blasse Nieren; mäßiges Lungenödem, deutliches Hirnödem; beginnende Verfettung der Leber; reduzierte Pankreas; beginnende Balkenblase.

Biochemische Befunde:

- Glucose im FVB: 95,4 mg/dl
- Glucose in der GKF: 860,4 mg/dl, Laktat in der GKF: 290,6 mg/dl, Summenformel nach Traub in der GKF: 1005,7 mg/dl
- Glucose in der CSF: 524 mg/dl, Laktat in der GKF: 434,6 mg/dl, Summenformel nach Traub in der CSF: 741,3 mg/dl
- Glucose im Urin: 261 mg/dl
- HbA1c im FVB: 108,9 mmol/mol

5. Diskussion

- Fructosamin in der GKF: 0 µmol/l, Fructosamin in der CSF: 383,4 µmol/l, Fructosamin im FVB: 115,8 µmol/l
- Anhydroglucitol im FVB: 0,5 µg/ml

5.3.9.3 S 212/12

Vorgeschichte: Herr J. (73 Jahre) habe mit seiner Frau zusammengelebt, diese sei allerdings für einige Zeit zu Verwandten verreist. Der Sohn habe am Mittag des 03.07.2012 versucht, ihn telefonisch zu erreichen. Dies sei nicht gelungen. Gegen 17 Uhr sei er an der Wohnung vorbeigefahren, die Situation sei ihm komisch vorgekommen, da das Schlafzimmerfenster offen gestanden habe. Er habe Herrn J. leblos neben dem Bett auf dem Boden vor dem offenen Fenster liegend aufgefunden. Der Notarzt habe den Tod festgestellt. Herr J. sei übergewichtig gewesen und habe Bluthochdruck gehabt, zudem habe er unter Luftnot gelitten und sei Träger eines Herzschrittmachers gewesen. Vor der Wohnungstür seien Zeitungen aufgefunden worden, die älteste mit Datum 30.06./01.07.2012.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 06.07.2012, das post mortem Intervall betrug 3 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: muskulöse Herzvergrößerung (700 g); mäßige Koronarsklerose; kleinfleckige weiße Narben in der Herzhinterwand; erhebliche muskuläre Wandverdickung der Speiseröhre in den unteren 2/3 bis auf 1 cm Dicke; flüssiger Mageninhalt mit feinsten schwärzlichen Flocken; wenig Teerstuhl in Anfangsabschnitten des Dünndarms; einzelne Schleimhauterosionen im Magen; minimal umbluteter Abbruch des rechten Kehlkopfoberhorns. a.e. hypostatisch bedingte Einblutungen in die Halsmuskulatur rechtsseitig; Hirnödeme und Lungenödeme; Zeichen der COPD: hart schneidbarer weit aufschneidbarer Bronchialbaum, Knistern des Lungengewebes bei Betasten, minimale Pulmonalsklerose.

Toxikologische und biochemische Befunde:

- Glucose in der GKF: 816,6 mg/dl, Laktat in der GKF: 582,3 mg/dl, Summenformel nach Traub in der GKF: 1007,8 mg/dl
- Glucose in der CSF: 321 mg/dl, Laktat in der GKF: 471,6 mg/dl, Summenformel nach Traub in der CSF: 556,8 mg/dl
- Glucose im Urin: 2559,4 mg/dl
- HbA1c im FVB: 87,1 mmol/mol
- Anhydroglucitol im FVB: 3,15 µg/ml

5. Diskussion

- Fructosamin in der GKF: 333 µmol/l, Fructosamin in der CSF: 286,4 µmol/l; Fructosamin im FVB: 169,2 µmol/l
- Aceton im FVB 855mg/l, Acetoacetat im FVB 2379 µmol/l, β-Hydroxybutyrat 6761µmol/l

5.3.9.4 S 213/12

Vorgeschichte: Herr W. (57 Jahre) sei insulinpflichtiger Diabetiker gewesen und habe an Prostatakrebs gelitten. Nach Angaben des Hausarztes habe er außerdem an einer Depression gelitten. Seine Ehefrau habe ihn am 03.07.2012 leblos im Bett liegend aufgefunden.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 09.07.2012, das post mortem Intervall betrug 6 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: Hirngewebsschwund, Hirnödeme; geringes Lungenödem; Blutfülle der inneren Organe; Verschmälerung und Fettdurchwachsung der Bauchspeicheldrüse; Prostata mit kleinen Knoten, Verkalkungen am Übergang zu den Samenbläschen; Zeichen der COPD: hart schneidbarer Bronchialbaum, Bronchiektasen, Lungengewebe knistert bei Betasten; Leberverfettung.

Toxikologische und biochemische Befunde:

- Glucose in der GKF: 488,6 mg/dl, Laktat in der GKF: 398,2 mg/dl, Summenformel nach Traub in der GKF: 687,7 mg/dl
- HbA1c im Femoralvenenblut: 85,5 mmol/mol
- Fructosamin in der GKF: 222 µmol/l; Fructosamin im FVB: 99,6 µmol/l
- Aceton 3280 mg/l, Acetoacetat 388 µmol/l, β-Hydroxybutyrat 24190 µmol/l

5.3.9.5 S11/10

Vorgeschichte: Der Sohn habe Frau H. (80 Jahre) am 31.12.2009 tot im Flur vor dem Badezimmer, bäuchlings, mit dem Kopf unter einem Schreibtisch aufgefunden. Der Sohn habe zuletzt am 29.12.2009 mit seiner Mutter telefoniert. Frau H. sei seit Jahren Diabetikerin gewesen. Sie habe häufiger über Schwindel geklagt. Sie sei am 27.10.2009 von einer Leiter gestürzt und habe seitdem Rückenschmerzen gehabt. Dabei habe sie sich keine Brüche zugezogen. Frau H. sei am 04., 08., 09., 11. und 17.12.09 bei ihrem Hausarzt wegen einer „Spritzentherapie“ gewesen. Am 29.12.09 habe sie dem Hausarzt gegenüber über Schwindel und Hörprobleme geklagt. Sie

5. Diskussion

leide weiter unter einem Hypertonus, einer Blasenschwäche und Auffälligkeiten an der Schilddrüse.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 08.01.2012, das post mortem Intervall betrug 8 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: wandhaftender Thrombus in der rechten Halsschlagader; thrombotischer Verschluss der inneren und äußeren Kopfschlagader der rechten Seite; Einblutungen in den linken Kopfwendermuskel und die rechte, dem Kehlkopf aufgelagerte Muskulatur sowie die linksseitige Mundbodenmuskulatur; deutliche Arteriosklerose des Schlagaderkranzes am Hirngrund; kein Hirnödem, keine Zeichen eines frischen oder älteren Hirninfarktes; deutliche Koronarsklerose ohne frische oder ältere Infarkte.

Toxikologische und biochemische Befunde:

- im FVB: Aceton 6132 mg/l, Acetoacetat 5384 µmol/l, β-Hydroxybutyrat 18540 µmol/l
- Glucose in der CSF: 216 mg/dl; Laktat in der CSF: 495 mg/dl; Summenformel nach Traub in der CSF: 464 mg/dl
- HbA1c: 74 mmol/mol
- Fructosamin im FVB: 110 µmol/l

5.3.9.6 S143/10

Vorgeschichte: Frau S. (58 Jahre) sei von ihrem Nachbarn, der sie zuletzt vor ca. 8 Tagen gesehen habe, tot im Bad aufgefunden worden. Frau S. habe sehr zurückgezogen gelebt, wirres Zeug geredet, sei wegen Schizophrenie im Krankenhaus behandelt worden und sei bekannte Alkoholikerin gewesen. Eine Sektion wurde zum Ausschluss von Fremdverschulden durchgeführt.

Obduktion: Obduktionsdatum war der 02.04.2010, das post mortem Intervall betrug 5 Tage. Folgende Obduktionsbefunde wurden festgehalten: Fettleber mit Fibrose und zwei bis kirschengroßen Hämangiomen; chronische calcifizierte Pankreatitis; Hirnatrophie.

Toxikologische und biochemische Befunde:

- Glucose in der CSF: 524 mg/dl; Laktat in der CSF: 465 mg/dl; Summenformel nach Traub in der CSF: 757 mg/dl
- HbA1c im FVB: 88,6 mmol/mol
- Fructosamin im FVB: 128,6 µmol/l
- FVB: Aceton 5023 mg/l, Acetoacetat 12511 µmol/l, β-Hydroxybutyrat 9896µmol/l

5. Diskussion

5.3.10 Anwendungsbeispiele Hypoglykämie

5.3.10.1 Suizid mit Humalog

Vorgeschichte: Eine Frau bat ihren Ehemann, sie im gemeinsamen Schlafzimmer alleine zu lassen. Sie wolle sich mit seinem Insulinvorrat – er ist Diabetiker – das Leben nehmen. Aus Rücksicht auf den Wunsch der Frau sollte der Ehemann erst nach einigen Stunden wieder ins Schlafzimmer gehen. Der Mann tat wie ihm aufgetragen und rief erst einige Stunden nach dem geäußerten Wunsch die Polizei, die die Ehefrau tot auf ihrem Bett vorfand.

Toxikologische und biochemische Befunde:

Insulin lispro in folgenden Matrices: FVB: 0 $\mu\text{U/ml}$, Herzblut: 0 $\mu\text{U/ml}$, GKF 103 $\mu\text{U/ml}$, mit Methanol extrahierte Injektionsstelle: 808 $\mu\text{U/g}$ (Abbildung 47), mit wässriger Natriumchlorid-Lösung extrahierte Injektionsstelle: 581 $\mu\text{U/g}$, Muskelgewebe: 373 $\mu\text{U/g}$, Nierengewebe: 384 $\mu\text{U/g}$, Gehirngewebe: 0 $\mu\text{U/g}$, Myokardgewebe: 0 $\mu\text{U/g}$, Lungengewebe: 0 $\mu\text{U/g}$, Lebergewebe: 0 $\mu\text{U/g}$, Mageninhalt: 0 $\mu\text{U/g}$. Abbildung 47 zeigt das Chromatogramm und das zugehörige Produktionenspektrum von Insulin lispro in der Injektionsstelle.

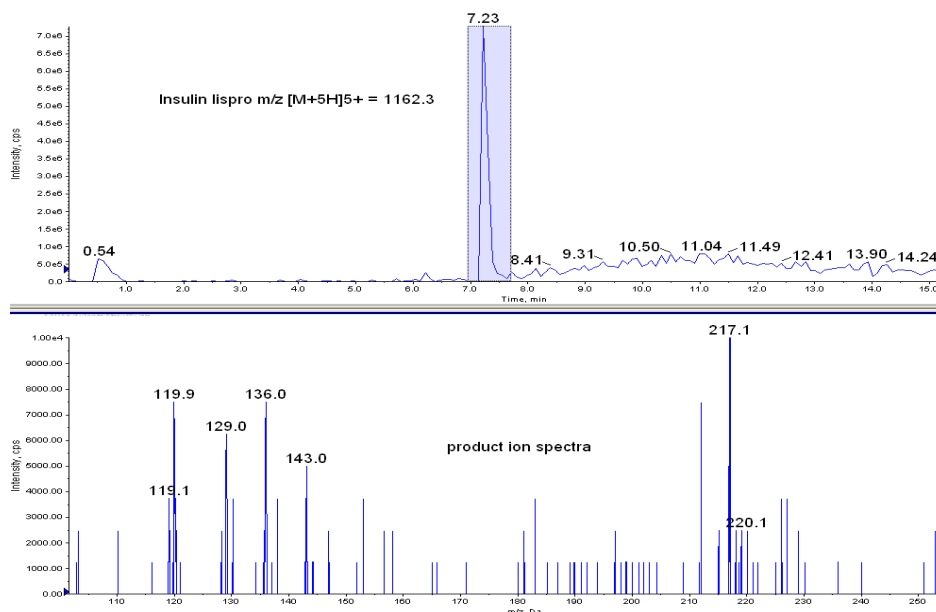


Abbildung 47: Chromatogramm von m/z ($[M+5H]^{5+}$) = 1162,5 und das dazugehörige Produktionenspektrum mit dem spezifischen Fragment m/z = 217 für Humalog in der extrahierten Injektionsstelle

5. Diskussion

5.3.10.2 Tötungsdelikt mit humanem Insulin

Vorgeschichte: Frau D. war eine aufgrund ihrer ständigen Extrawünsche bei den Stationsschwestern ungeliebte Bewohnerin einer Seniorenwohnanlage in S. Eines Abends nach dem Abendessen verlor sie nach Symptomen wie Zittern und Blässe das Bewusstsein. Der herbeieilende Arzt konnte an Ort und Stelle eine Blutglucosekonzentration von 26 mg/dl feststellen und ordnete das Verbringen in ein Krankenaus an. Vom Notarzt wurde eine Blutglucosekonzentration von 17 mg/dl festgestellt. Nach Eintreffen des Notarztes und Behandlung mit 40%iger Glucoselösung stieg der Blutzucker auf 203 mg/dl an, um nur eine viertel Stunde später wieder auf 86 mg/dl zu sinken. Frau D. überlebte den Vorfall nach intensiven Glukagon- und Glucoseinfusionen über 4 Tage. Glücklicherweise wurde noch vom Notarzt ein Röhrchen Blut abgenommen, sofort zentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert. Der Verdacht keimte auf, dass eine der Nachtschwestern Frau D. ein hypoglykämisches Agens verabreicht haben könnte. Eine der Nachtschwestern hatte schon bei früheren Anlässen selbstständig Medikamente verabreicht. Im Computer der Verdächtigen wurde dann ein Bekennerbrief gefunden. In diesem wurde die Tat gestanden und der Hinweis gegeben, dass „sowohl 2 Fertipens Insulin Rapid als auch 2 Fertipens Actraphane 30/70 (30 % Normalinsulin und 70 % NPH Insulin) über eine Zeitspanne von 3-5 Stunden gegeben wurde. Die letzte Spritze habe Frau D. laut diesem Brief 7-8 Stunden, bevor die hypoglykämische Episode erkannt wurde, erhalten.

Analytik: Im Serum der Frau B. vom Tag des Vorfalls wurde eine Humaninsulin-Konzentration von 5,18 mU/ml (= 37369 pmol/l) quantifiziert. In einer Probe, die später am Tag genommen wurde, wurde eine Konzentration von 2,86 mU/ml gefunden. Serumproben 2 und 3 Tage nach dem Vorfall enthielten kein humanes Insulin mehr. In keiner der Proben wurden synthetische Insuline nachgewiesen. Die C-Peptid-Konzentration in der Probe vom Vorfall war 336 pmol/l, sodass sich ein I:C-Verhältnis von 111 ergibt. Die Proinsulin-Konzentration lag bei 5,3 pmol/l.

6. Zusammenfassung und Ausblick

6 Zusammenfassung und Ausblick

Folgen einer Diabeteserkrankung sind die siebthäufigste Todesursache der Welt. Stoffwechsellentgleisungen bei Lebenden sind außergewöhnlich häufig zu verzeichnen und stellen z.B. bei der aktiven Teilnahme am Straßenverkehr eine Gefahr dar. Akute Komplikationen und Entgleisungen des Kohlenhydratstoffwechsels sind das diabetische Koma (diabetische Ketoazidose oder hyperosmolares Koma) und die Hypoglykämie. Die Diagnose dieser Komplikationen gerade bei forensischen Fragestellungen ist oft problematisch, bei Todesfällen auch aufgrund fehlender charakteristischer Obduktionsbefunde.

Werden bei der Insulin-Diagnostik bisher vornehmlich immunchemische Verfahren im klinischen Alltag eingesetzt, wurden nun chromatographisch-massenspektrometrische Methoden zur Bestimmung von relevanten Parametern zum Nachweis der Ursache einer Hypoglykämie (humanes Insulin, C-Peptid, synthetische Insulinanaloga, orale Antidiabetika) und zum Nachweis einer Hyperglykämie (Anhydroglucitol, Methylglyoxal) entwickelt und validiert. Damit ist das Labor der forensischen Toxikologie zukünftig in der Lage, bei diesen Fragestellungen beweissichere analytische Belege zu erbringen.

Die Methoden wurden an 480 klinischen Realproben von Diabetikern und forensischen Proben wurden diese Methoden getestet. Die einzelnen Parameter (Glucose, HbA1c, Fructosamin, Anhydroglucitol, humanes Insulin, C-Peptid und Proinsulin) wurden miteinander korreliert, um die Zusammenhänge der Diabetesmarker nachvollziehen zu können. Das Diabetikerkollektiv wurde nach seiner Medikation (ohne Medikation, Einnahme von Sulfonylharnstoffen, Injektion mit humanem Insulin, Injektion synthetischer Insuline) eingeteilt, um Konzentrationsbereiche von humanem Insulin, des C-Peptids, Proinsulin und des I:C-Verhältnisses zu gewinnen, die einen Rückschluss auf die Medikation/Einstellung zulassen können.

Bei 134 Obduktionen der vergangenen Jahre aus dem Obduktionsgut der Institute für Rechtsmedizin Bonn und Düsseldorf wurden die forensisch relevanten Matrices Femoralvenenblut, Urin, Glaskörperflüssigkeit und Liquor cerebrospinalis entnommen. Die einzelnen Parameter (Glucose, Laktat, Summenformel nach Traub, HbA1c, Fructosamin, Anhydroglucitol) wurden miteinander korreliert, um die Zusammenhänge der Diabetesmarker auch nach dem Tod nachvollziehen zu können. Die Nachweisbarkeit von humanem Insulin und seinen synthetischen

6. Zusammenfassung und Ausblick

Analoga in post mortem Flüssigkeiten konnte an 2 Fallbeispielen dargelegt werden. Die Möglichkeit der Detektion eines diabetischen Komats post mortem wird anhand von 6 Fallbeispielen diskutiert.

Bei Verdacht auf eine Hypoglykämie post mortem gestaltet sich der Nachweis der Hypoglykämie selbst über die Summenformel nach Traub als schwierig. Cut-Offs für die Summenformel nach Traub sollten bei 25 mg/dl liegen. Ein extrem geringer HbA1c bei behandelten Diabetikern spricht weiterhin für periodisch aufgetretene hypoglykämische Episoden. Neben dem Nachweis einer Hypoglykämie sollte auch die Klärung der Ursache gelingen. Orale Antidiabetika des Sulfonylharnstoff-, des Glinid-, des Glitazon- und des Gliptin-Typs können Hypoglykämien auslösen und nach LLE präzise von subtherapeutischen bis Überdosiskonzentrationen nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Injektion von humanem Insulin sollten Nüchtern-Insulinkonzentrationen $> 500 \text{ pmol/l}$ den Verdacht auf eine Insulininjektion lenken, die zusätzliche C-Peptid-Analytik ist aber unerlässlich. Ein Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid $> 0,22$ im nüchternen Zustand in den der Injektion folgenden 180 min spricht sehr für die Injektion von Insulin. Post mortem sollte bei der Obduktion neben den gängigen Materialien FVB und Urin auch die GKF entnommen werden. In FVB und GKF ist humanes Insulin normalerweise nicht nachweisbar. Erst in Überdosissituationen kann humanes oder synthetische Insuline in der GKF nachgewiesen werden. Für die Praxis wird, wenn möglich, eine Insulinbestimmung aus Serum empfohlen, am besten in ante mortem Material von Verstorbenen. Weiterhin konnte in einem Fall gezeigt werden, dass die Injektionsstelle und weitere Organe für einen chromatographischen Nachweis von humanem/synthetischen Insulinen nach Immunoaffinitätsaufreinigung mit magnetischen beads als geeignete Untersuchungsmaterialien gelten können.

Für die Diagnose „Diabetes“ post mortem stehen neben pathomorphologischen und histologischen Befunden biochemische Messungen zur Verfügung. Hinweise geben ein HbA1c $> 6,5 \%$, Fructosamin im Serum $> 300 \text{ } \mu\text{mol/l}$ im Serum, $> 100 \text{ } \mu\text{mol/l}$ in der GKF und $> 150 \text{ } \mu\text{mol/l}$ in der CSF, Anhydroglucitol $< 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ im FVB. Umgekehrt schließen aber andere Ergebnisse bzgl. dieser Parameter einen Diabetes nicht aus. Methylglyoxal eignet sich nicht als post mortem Marker, da nach dem Tod ein enormer Anstieg der Konzentrationen sowohl bei Kontrollfällen als auch bei Fällen mit einer diabetischen Stoffwechsellentgleisung auftritt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Frage nach einem diabetischen Koma wird zusätzlich eine Analyse auf Ketonkörper empfohlen, eine Glucosekonzentration in der GKF > 180 mg/dl als verlässlichsten Hinweis auf eine diabetische Stoffwechsellage zu betrachten. Zusätzlich kann die Messung von Laktat in der GKF und der CSF und damit die Summenformel > 450 mg/dl in diesen Matrices ergänzend auf ein diabetisches Koma hindeuten. Die Miteinbeziehung der Laktatkonzentration ergibt aber keinen Vorteil. Eine hohe Glucosekonzentration im Urin wird nur in Fällen mit diabetischem Koma beobachtet, sodass diese durchaus einen Hinweis auf diese Todesursache geben kann. Umgekehrt ist eine niedrige Glucosekonzentration im Urin aber kein Argument, ein diabetisches Koma auszuschließen. Erhöhte HbA1c-Konzentrationen und stark erniedrigte Anhydroglucitol-Konzentrationen korrelieren mit der Summenformel nach Traub und geben weitere Hinweise. In der Regel muss die Diagnose „diabetische Stoffwechsellage“ aber immer eine Zusammenstellung von Befunden aus Anamnese, Obduktion, Histologie und forensischer Chemie erfolgen.

Weiterer Forschungsbedarf besteht für die Untersuchung der Insulin- und C-Peptid-Stabilität in realen postmortalen Blutproben und in anderen Matrices. Das Verhalten von Anhydroglucitol im Urin ante und post mortem ist noch wenig untersucht und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. AG-Konzentrationen im Urin und Blutglucosekonzentrationen korrelieren aufgrund der Konkurrenz der beiden Zucker zur Rückresorption in der Niere positiv miteinander, was sich auch die Forensik bei der Diagnose von hyperglykämischen Stoffwechsellagen zunutze machen könnte.

7. Abbildungsverzeichnis

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese einer diabetischen Ketoazidose und eines hyperosmolaren Komats	8
Abbildung 2: Abbau von Proinsulin zu Insulin und C-Peptid	16
Abbildung 3: Strukturen von Humaninsulin und dessen synthetischen Analoga	18
Abbildung 4 : Chemische Strukturen oraler Antidiabetika	26
Abbildung 5: Strukturformel von Methylglyoxal	26
Abbildung 6: Synthese und Metabolismus von MG	28
Abbildung 7: Bildung von verschiedenen AGEs durch Reaktion von MG	27
Abbildung 8: Strukturformel von AG	29
Abbildung 9: Aufbau einer ESI-Quelle	43
Abbildung 10: Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers	43
Abbildung 11: Prinzip des Multiple Reaction Monitoring und der Produktionen-Analyse	45
Abbildung 12: Derivatisierung von MG und des IS mit 2,3-Diaminonaphthalen	71
Abbildung 13: Reaktion von Hydroxybutyrat zu Aceton	74
Abbildung 14: Chromatographische Trennung und Produktionenspektren von humanem Insulin und seinen synthetischen Analoga	80
Abbildung 15: Stabilität der Konzentration von humanem Insulin in Serumproben	80
Abbildung 16: Chromatogramm C-Peptid	82
Abbildung 17: Chromatogramme orale Antidiabetika	84
Abbildung 18: Chromatogramm MG	89
Abbildung 19: Chromatogramm AG	90
Abbildung 20: Glucosekonzentrationen in klinischen Proben	91
Abbildung 21: HbA1c-Konzentrationen in klinischen Proben	92
Abbildung 22: Fructosamin-Konzentrationen in klinischen Proben	93
Abbildung 23: Konzentrationen von humanem Insulin in klinischen Proben	92
Abbildung 24: Konzentrationen von humanem Insulin der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive	95
Abbildung 25: Vergleich der beiden Methoden für humanes Insulin	95
Abbildung 26: C-Peptid-Konzentrationen in klinischen Proben	98
Abbildung 27: C-Peptid-Konzentrationen der nach ihrer Medikation eingeteilten Kollektive	98
Abbildung 28: I:C-Verhältnisse	100
Abbildung 29: Proinsulin-Konzentrationen	101
Abbildung 30: Proinsulin-Konzentrationen on Diabetikern geordnet nach ihrer Therapie	102
Abbildung 31: klinische MG-Serumkonzentrationen	103
Abbildung 32: klinische AG-Konzentrationen	103
Abbildung 33: Korrelation der Glucosekonzentration mit den Langzeitmarkern HbA1c, Fructosamin und AG und Korrelationen dieser untereinander	106
Abbildung 34: Korrelation von Humaninsulin-, C-Pepid-, Proinsulinkonzentration und I : C-Verhältnis mit der Glucosekonzentration und untereinander	108
Abbildung 35: Glucosekonzentrationen post mortem in GKF, CSF und Urin	108

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Laktatkonzentrationen post mortem in GKF, CSF und Urin	110
Abbildung 37: Summenformeln nach Traub in GKF und CSF	111
Abbildung 38: HbA1c-Konzentrationen post mortem	111
Abbildung 39: Fructosamin-Konzentrationen post mortem	112
Abbildung 40: MG-Konzentrationen post mortem	114
Abbildung 41: AG-Konzentrationen post mortem	115
Abbildung 42: Korrelation der Glucose- bzw. Laktatkonzentrationen und der Summenformeln in der GKF und der CSF und Korrelation der Glucosekonzentration im Urin mit der Summenformel nach Traub in der GKF und in der CSF	116
Abbildung 43: Korrelation der HbA1c-Konzentration post mortem mit der Summenformel nach Traub in der GKF und in der CSF	117
Abbildung 44: Korrelation der Summenformel nach Traub in der GKF mit der MG-Konzentration und der AG-Konzentration post mortem im FVB	117
Abbildung 45: Korrelationen der Fructosamin-Konzentration in Serum, GKF und CSF post mortem mit der Summenformel in der GKF und dem HbA1c	118
Abbildung 46: Typische pathomorphologische Auffälligkeiten post mortem bei diabetischem Koma	153
Abbildung 47: Chromatogramm von m/z ($[M+5H]^{5+}$) = 1162,5 und das dazugehörige Produktionenspektrum mit dem spezifischen Fragment m/z = 217 für Humalog in der extrahierten Injektionsstelle	160

8. Tabellenverzeichnis

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Optionale Kriterien für eine Diagnose von Diabetes	3
Tabelle 2: Definition einer Hypoglykämie und die Reaktionen des menschlichen Körpers bei sinkender Glucosekonzentration	8
Tabelle 3 : Mögliche Syptome einer Hypoglykämie	9
Tabelle 4: Referenzkonzentrationen von Glucose und Laktat	10
Tabelle 5: Referenzkonzentrationen HbA1c und Fructosamin	13
Tabelle 6: Wirkbeginn, Wirkhöhepunkt und Wirkdauer von Normalinsulin und synthetischen Insulinen auf dem Arzneimittelmarkt	19
Tabelle 7: Referenzkonzentrationen von humanem Insulin, C-Peptid, dem molaren Verhältnis Insulin : C-Peptid und von Proinsulin	21
Tabelle 8: Pharmakokinetik und biologisches Verhalten der Sulfonylharnstoffe	21
Tabelle 9: Wirkstoffgruppen, Wirkmechanismen, Wirkstoffe und Hauptmetabolite der oralen Antidiabetika	24
Tabelle 10: Referenzkonzentrationen für MG	29
Tabelle 11: Glucose- und Laktatkonzentrationen post mortem	39
Tabelle 12: Chemikalien und Reagenzien allgemein	51
Tabelle 13: Massenspektrometrische Daten und Parameter Insuline	61
Tabelle 14: Optimierte massenspektrometrische Parameter Methode C-Peptid	64
Tabelle 15: Chemikalien für die Analytik oraler Antidiabetika	65
Tabelle 16: Optimierte Ionenübergänge, Kollisionsenergien und relative Ionenintensitäten orale Antidiabetika	67
Tabelle 17: Konzentrationen der gespikten Plasmaproben für Linearitätsstudien orale Antidiabetika	69
Tabelle 18: Massenspektrometrische Daten MG-Methodsik	71
Tabelle 19: Validierungsdaten der Insuline in humanem Serum	81
Tabelle 20: Genauigkeit des Messinstruments und Stabilitätsdaten orale Antidiabetika	84
Tabelle 21: Matrixeffekte und Wiederfindungsraten orale Antidiabetika	86
Tabelle 22: Genauigkeitsdaten orale Antidiabetika	87
Tabelle 23: Gemessene Konzentrationsbereiche der oralen antihyperglykämischen Wirkstoffe bei diabetischen Patienten	88
Tabelle 24: Konzentrationen von humanem Insulin der nach Medikation eingeteilten Kollektive	94
Tabelle 25: Konzentrationen in klinischen Serumproben von Diabetikern mit synthetischen Insulinen	97
Tabelle 26: C-Peptid-Konzentrationen von Diabetikern	99
Tabelle 27: Konzentrationen des I:C-Verhältnisses	98
Tabelle 28: Proinsulin-Konzentrationen	102
Tabelle 29: Veränderungen der MG-Konzentrationen [ng/ml] in den Tagen nach der Obduktion	113
Tabelle 30: Glucose-, Laktatkonzentration und die Summenformel nach Traub in der GKF und der CSF, HbA1c und Ketonkörper für alle Fälle mit der Todesursache diabetische Ketoazidose.	142

9. Literaturverzeichnis

9 Literaturverzeichnis

1. International Diabetes Federation. <http://derstandard.at/1254311950510/285-Millionen-Diabetiker-weltweit>. 2009.Zugriff Mai 2012.
2. Andresen EM, Lee JA, Pecoraro RE, Koepsell TD, Hallstrom AP, Siscovick DS. Underreporting of diabetes on death certificates, King County, Washington. *Am J Public Health* 1993;83:1021-4.
3. Fuller JH. Mortality trends and causes of death in diabetic patients. *Diabete Metab* 1993;19:96-9.
4. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.
5. Rathmann W, Haastert B, Icks A, et al. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 2003;46:182-9.
6. Federal Statistic Office Germany. http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/11/PD07__454__232,templateId=renderPrint.psml. 2007.Zugriff Mai 2012.
7. Hauner H. Diabetesepidemie und Dunkelziffer.In: Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2008, Deutsche Diabetes Union e.V.,Kirchheim + Co GmbH Mainz, p.7-11. 2007.
8. Sacks DB, Brun DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
9. Thomas L. Labor und Diagnose. Indikationen und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5.erweiterte Auflage, TH Books. 2000.
10. Faich GA, Fishbein HA, Ellis SE. The epidemiology of diabetic acidosis: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1983;117:551-8.
11. Standards of medical care in diabetes 2006. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl 1:S4-42.:S4-42.
12. Gouni-Berthold I, Krone W. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state. *Med Klin (Munich)* 2006;101 Suppl 1:100-5.:100-5.
13. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, et al. Hyperglycemic crises in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S94-102.:S94-102.
14. Hirabayashi S, Kitahara T, Hishida T. Computed tomography in perinatal hypoxic and hypoglycemic encephalopathy with emphasis on follow-up studies. *J Comput Assist Tomogr* 1980;4:451-6.
15. Cryer PE. Glucose counterregulation in man. *Diabetes* 1981;30:261-4.
16. MacLeod KM, Hepburn DA, Frier BM. Frequency and morbidity of severe hypoglycaemia in insulin-treated diabetic patients. *Diabet Med* 1993;10:238-45.
17. Nilsson A, Tideholm B, Kalen J, Katzman P. Incidence of severe hypoglycemia and its causes in insulin-treated diabetics. *Acta Med Scand* 1988;224:257-62.
18. Epidemiology of severe hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. The DCCT Research Group. *Am J Med* 1991;90:450-9.
19. Mokan M. The phenomenon of unawareness of hypoglycemia. *Vnitr Lek* 2001;47:298-303.
20. Muhlhauser I, Berger M, Sonnenberg G, et al. Incidence and management of severe hypoglycemia in 434 adults with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1985;8:268-73.
21. Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med* 2005;352:174-83.
22. Rodriguez PC, Lizondo EA, Lopez Garcia MJ, Escriva CL, Alpera LR, Collado PC. A study of variability in glycaemia in children and adolescents with diabetes mellitus type 1 on treatment with insulin glargine. *An Pediatr (Barc)* 2008;69:426-31.
23. Mitrakou A, Ryan C, Veneman T, et al. Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *Am J Physiol* 1991;260:E67-E74.

9. Literaturverzeichnis

24. Butler PC, Rizza RA. Regulation of carbohydrate metabolism and response to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18:1-25.
25. Megarbane B, Deye N, Bloch V, et al. Intentional overdose with insulin: prognostic factors and toxicokinetic/toxicodynamic profiles. *Crit Care* 2007;11:R115.
26. Barnett AH, Leslie D, Watkins PJ. Can insulin-treated diabetics be given beta-adrenergic blocking drugs? *Br Med J* 1980;280:976-8.
27. Lawrence AM, Hagen TC. Propranolol-associated hypoglycemia. *N Engl J Med* 1983;309:1327-8.
28. Amiel SA, Dixon T, Mann R, Jameson K. Hypoglycaemia in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2008;25:245-54.
29. Jennings AM, Wilson RM, Ward JD. Symptomatic hypoglycemia in NIDDM patients treated with oral hypoglycemic agents. *Diabetes Care* 1989;12:203-8.
30. Holstein A, Plaschke A, Egberts EH. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:467-73.
31. Holstein A, Plaschke A, Hammer C, Egberts EH. Characteristics and time course of severe glimepiride- versus glibenclamide-induced hypoglycaemia. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:91-7.
32. Stevens AB, Roberts M, McKane R, Atkinson AB, Bell PM, Hayes JR. Motor vehicle driving among diabetics taking insulin and non-diabetics. *BMJ* 1989;299:591-5.
33. Madea B. Verkehrsmedizin. Fahreignung, Fahrsicherheit, Unfallkonstruktion. Deutscher Ärzte Verlag. In: Mußhoff F BG, ed. 2007.
34. Cox DJ, Penberthy JK, Zrebiec J, et al. Diabetes and driving mishaps: frequency and correlations from a multinational survey. *Diabetes Care* 2003;26:2329-34.
35. Harsch IA, Stocker S, Radespiel-Troger M, et al. Traffic hypoglycaemias and accidents in patients with diabetes mellitus treated with different antidiabetic regimens. *J Intern Med* 2002;252:352-60.
36. MacLeod KM. Diabetes and driving: towards equitable, evidence-based decision-making. *Diabet Med* 1999;16:282-90.
37. Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Kovatchev BP, Julian DM, Clarke WL. Progressive hypoglycemia's impact on driving simulation performance. Occurrence, awareness and correction. *Diabetes Care* 2000;23:163-70.
38. Graveling AJ, Warren RE, Frier BM. Hypoglycaemia and driving in people with insulin-treated diabetes: adherence to recommendations for avoidance. *Diabet Med* 2004;21:1014-9.
39. R Penning. Alkohol, Drogen und Verkehrssicherheit. UNI-MED Verlag AG. 4.Auflage.
40. Huismans H. Lexikon der klinischen Diabetologie. Deutscher Ärzte Verlag. 2008.
41. <http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/presse/pressemeldungen/meldungen-detailansicht/article/verkehrsmedizinische-gutachten-fuer-menschen-mit-diabetes-ddg-passt-arzt-suche-an-eu-fuehrerscheinri.html?cHash=8debfbd076af303323a8847a9d7be07>. 2013. Zugriff Januar 2013.
42. Lai MW, Klein-Schwartz W, Rodgers GC, et al. 2005 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' national poisoning and exposure database. *Clin Toxicol (Phila)* 2006;44:803-932.
43. Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR, Jr., Green JL, Rumack BH, Heard SE. 2007 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 25th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)* 2008;46:927-1057.
44. von Mach MA, Meyer S, Omogbehin B, Kann PH, Weilemann LS. Epidemiological assessment of 160 cases of insulin overdose recorded in a regional poisons unit. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42:277-80.
45. Arem R, Zoghbi W. Insulin overdose in eight patients: insulin pharmacokinetics and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1985;64:323-32.
46. Kaminer Y, Robbins DR. Attempted suicide by insulin overdose in insulin-dependent diabetic adolescents. *Pediatrics* 1988;81:526-8.
47. Marks V. Murder by insulin. *Med Leg J* 1999;67:147-63.
48. Marks V. Insulin murders. *Med Leg J* 2009;77:39-47.

9. Literaturverzeichnis

49. Eledrisi MS, Alshanti MS, Shah MF, Brolosy B, Jaha N. Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *Am J Med Sci* 2006;331:243-51.
50. Falk H. Praktische Sektionsdiagnostik mit Schnellmethoden. Veb Georg Thieme Leipzig. In: Pfeifer K, ed. 196
51. Beckmann ER, Puschel K, Picht S. [Pathomorphology of diabetes mellitus and diabetic coma]. *Beitr Gerichtl Med* 1984;42:307-13.:307-13.
52. Reimann W. *Vademecum Gerichtsmedizin*. 4.Auflage Berlin Volk und Gesundheit. In: Prokop O GG, ed. 1985.
53. Schibel N. Zur postmortalen Diagnose von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels. Doctora thesis at the institute of legal medicine Berlin. 2007.
54. Matsumura M, Nakashima A, Tofuku Y. Electrolyte disorders following massive insulin overdose in a patient with type 2 diabetes. *Intern Med* 2000;39:55-7.
55. Jolliet P, Leverve X, Pichard C. Acute hepatic steatosis complicating massive insulin overdose and excessive glucose administration. *Intensive Care Med* 2001;27:313-6.
56. Ortega E, Wagner A, Caixas A, Barcons M, Corcoy R. Hypoglycemia and pulmonary edema: a forgotten association. *Diabetes Care* 2000;23:1023-4.
57. Hood I, Mirchandani H, Monforte J, Stacer W. Immunohistochemical demonstration of homicidal insulin injection site. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:973-4.
58. Gressner. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Band 1: Klinische Chemie. In: Arndt, ed. 2006.
59. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Am J Med* 1981;70:325-30.
60. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31:1473-8.
61. Cefalu WT, Wang ZQ, Bell-Farrow A, Kiger FD, Izlar C. Glycohemoglobin measured by automated affinity HPLC correlates with both short-term and long-term antecedent glycemia. *Clin Chem* 1994;40:1317-21.
62. Goldstein DE, Walker B, Rawlings SS, et al. Hemoglobin A1c levels in children and adolescents with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1980;3:503-7.
63. Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1081-2.
64. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* 1995;18:440-7.
65. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1983;127:87-95.
66. Mayer TK, Freedman ZR. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin Chim Acta* 1983;127:147-84.
67. Ritz S, Mehlan G, Martz W. Postmortem diagnosis of diabetic metabolic derangement: elevated alpha 1-antitrypsin and haptoglobin glycosylation levels as an index of antemortem hyperglycemia. *J Forensic Sci* 1996;41:94-100.
68. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
69. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
70. Osuna E, Garcia-Villora A, Perez-Carceles M, et al. Glucose and lactate in vitreous humor compared with the determination of fructosamine for the postmortem diagnosis of diabetes mellitus. *Am J Forensic Med Pathol* 2001;22:244-9.
71. Type 2 diabetes in children and adolescents. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2000;23:381-9.
72. Uemura K, Shintani-Ishida K, Saka K, et al. Biochemical blood markers and sampling sites in forensic autopsy. *J Forensic Leg Med* 2008;15:312-7.
73. Kernbach G, Puschel K, Brinkmann B. [Biochemical measurements of glucose metabolism in relation to cause of death and postmortem effects]. *Z Rechtsmed* 1986;96:199-213.

9. Literaturverzeichnis

74. Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab* 1999;25:459-76.
75. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, et al. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes* 1996;45:242-56.
76. Karam JH. Pancreatic hormones and diabetes mellitus.
77. Galloway JA, Hooper SA, Spradlin CT, et al. Biosynthetic human proinsulin. Review of chemistry, in vitro and in vivo receptor binding, animal and human pharmacology studies, and clinical trial experience. *Diabetes Care* 1992;15:666-92.
78. Lüllmann, Mohr: Lehrbuch der Pharmakologie. Thieme Verlag, Stuttgart. 2006.
79. Sheldon B, Russell-Jones D, Wright J. Insulin analogues: an example of applied medical science. *Diabetes Obes Metab* 2009;11:5-19.
80. Wark G. How to look for insulin etc. In: SAS Peptide Hormone Section RGPFS, ed. 2009.
81. Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann Clin Biochem* 1999;36:541-64.
82. Kruszynska YT, Home PD, Hanning I, Alberti KG. Basal and 24-h C-peptide and insulin secretion rate in normal man. *Diabetologia* 1987;30:16-21.
83. Roberge RJ, Martin TG, Delbridge TR. Intentional massive insulin overdose: recognition and management. *Ann Emerg Med* 1993;22:228-34.
84. Service FJ. Hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26:937-55.
85. Iwase H, Kobayashi M, Nakajima M, Takatori T. The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdosage. *Forensic Sci Int* 2001;115:123-7.
86. Batalis NI, Prahlow JA. Accidental insulin overdose. *J Forensic Sci* 2004;49:1117-20.
87. Mayors FH. *Review of Medical Pharmacology* ed 7. Los Altos, California, Lange Medical Publications. In: Jawetz E, Goldfein A, ed. 1980.
88. Guyton. Insulin, Glucagon and Diabetes. In: *Textbook of medical physiology*, 8th edn. Philadelphia. WB Saunders 20, Chp 78. 1991.
89. Katzen HM, Tietze F, Stetten D, Jr. Further studies on the properties of hepatic glutathione-insulin transhydro-genase. *J Biol Chem* 1963;238:1006-11.:1006-11.
90. Lebowitz MR, Blumenthal SA. The molar ratio of insulin to C-peptide. An aid to the diagnosis of hypoglycemia due to surreptitious (or inadvertent) insulin administration. *Arch Intern Med* 1993;153:650-5.
91. Horwitz DL, Starr JI, Mako ME, Blackard WG, Rubenstein AH. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J Clin Invest* 1975;55:1278-83.
92. Hampton SM, Beyzavi K, Teale D, Marks V. A direct assay for proinsulin in plasma and its applications in hypoglycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;29:9-16.
93. Ostrega D, Polonsky K, Nagi D, et al. Measurement of proinsulin and intermediates. Validation of immunoassay methods by high-performance liquid chromatography. *Diabetes* 1995;44:437-40.
94. Alsever RN, Roberts JP, Gerber JG, Mako ME, Rubenstein AH. Insulinoma with low circulating insulin levels: the diagnostic value of proinsulin measurements. *Ann Intern Med* 1975;82:347-50.
95. Ward WK, LaCava EC, Paquette TL, Beard JC, Wallum BJ, Porte D, Jr. Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in experimental insulin resistance. *Diabetologia* 1987;30:698-702.
96. Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY. Proinsulin as a marker for the development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes* 1995;44:173-9.
97. Vezzosi D, Bennet A, Fauvel J, Caron P. Insulin, C-peptide and proinsulin for the biochemical diagnosis of hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol* 2007;157:75-83.
98. Kippen AD, Cerini F, Vadas L, et al. Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide, and proinsulin levels in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J Biol Chem* 1997;272:12513-22.

9. Literaturverzeichnis

99. Darby SM, Miller ML, Allen RO, LeBeau M. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. *J Anal Toxicol* 2001;25:8-14.
100. Cabaleiro DR, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, Thienpont LM. Feasibility of standardization of serum C-peptide immunoassays with isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:1193-6.
101. Boyko EJ, Keane EM, Marshall JA, Hamman RF. Higher insulin and C-peptide concentrations in Hispanic population at high risk for NIDDM. San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes* 1991;40:509-15.
102. Human Intakt Proinsulin ELISA. Testanleitung deutsch. TECO Medical Group. 2012.
103. Tillil H, Shapiro ET, Miller MA, et al. Dose-dependent effects of oral and intravenous glucose on insulin secretion and clearance in normal humans. *Am J Physiol* 1988;254:E349-E357.
104. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
105. Marks V, Teale JD. Hypoglycaemia in the adult. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993;7:705-29.
106. Service FJ. Hypoglycemic disorders. *N Engl J Med* 1995;332:1144-52.
107. Service FJ. Hypoglycemia. *Med Clin North Am* 1995;79:1-8.
108. Service FJ, O'Brien PC, McMahon MM, Kao PC. C-peptide during the prolonged fast in insulinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:655-9.
109. Lindquist O, Rammer L. Insulin in post-mortem blood. *Z Rechtsmed* 1975;75:275-7.
110. Bour H. Coma hypoglycémique mortel par suicide à l'insuline. In: Roman M, Hecht H, eds., 36 Edn 1960.
111. Gulzow M. Suicide with insuline, *Ztschr Klin Med* 1951 (148); pp 479.
112. Martin FI, Hansen N, Warne GL. Attempted suicide by insulin overdose in insulin-requiring diabetics. *Med J Aust* 1977;1:58-60.
113. Lindgren L. Enormous dose of insulin with suicidal intent. *Acta Med Scand* 1960;167:297-300.:297-300.
114. Kernbach-Wighton G, Puschel K. On the phenomenology of lethal applications of insulin. *Forensic Sci Int* 1998;93:61-73.
115. Boyle PJ, Kempers SF, O'Connor AM, Nagy RJ. Brain glucose uptake and unawareness of hypoglycemia in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;333:1726-31.
116. Gordon MR, Flockhart D, Zawadzki JK, Taylor T, Ramey JN, Eastman RC. Hypoglycemia due to inadvertent dispensing of chlorpropamide. *Am J Med* 1988;85:271-2.
117. Amaryl (Fachinformation), Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: Oktober 1996.
118. Artosin (Fachinformation), Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: Mai 1992. 2012.
119. Campbell RK. Glimpiride: role of a new sulfonylurea in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 1998;32:1044-52.
120. Diamicon (Fachinformation) Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service, Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: August 1996.
121. Euglucon (Fachinformation) Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service, Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: April 1994. 2012.
122. Glurenorm (Fachinformation) Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service, Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: Januar 1999.
123. Gluborid (Fachinformation) Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Fachinfo-Service, Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand: August 1991.
124. Kopitar Z, Koss FW. [Pharmacokinetic behaviour of gliquidone (AR-DF 26), a new sulfonyl urea. Summary of the studies so far (author's transl)]. *Arzneimittelforschung* 1975;25:1933-8.

9. Literaturverzeichnis

125. Langtry HD, Balfour JA. Glimepiride. A review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 1998;55:563-84.
126. Luzi L, Pozza G. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? *Acta Diabetol* 1997;34:239-44.
127. Pro-Diaban (Fachinformation) Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Fachinfo-Service, Postfach 1255, D-88322 Aulendorf; Stand 1995.
128. Zilker T. Serumspiegel von Glurenorm in Abhängigkeit von Dosishöhe und Dosisintervall., 35 Edn 1975.
129. Pharmazeutische Zeitung online. Sulfonylharnstoffe. Stellenwert in der medikamentösen Therapie des Typ-2-Diabetikers. http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=titel_09_2000. 2010. Zugriff August 2012.
130. Harrower AD. Comparison of diabetic control in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients treated with different sulphonylureas. *Curr Med Res Opin* 1985;9:676-80.
131. Igawa M. Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC post-column reaction detector. In: Munger JW HM, ed., 23 Edn 1989.
132. IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Methylglyoxal. In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 51, IARC, Lyon. 1991.
133. Moree-Testa P. Determination of alpha-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. In: Saint-Jalm Y, ed., 217 Edn 1981.
134. Desai KM, Chang T, Wang H, et al. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:273-84.
135. Urata G, Granick S. Biosynthesis of alpha-aminoketones and the metabolism of aminoacetone. *J Biol Chem* 1963;238:811-20.:811-20.
136. Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003;1647:193-9.
137. Coleman DL. Acetone metabolism in mice: increased activity in mice heterozygous for obesity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:290-3.
138. Casazza JP, Felver ME, Veech RL. The metabolism of acetone in rat. *J Biol Chem* 1984;259:231-6.
139. Kapalos MP. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications., 110 Edn 1999.
140. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1988;40:243-88.
141. Phillips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 1993;212:101-5.
142. Richard JP. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 1993;21:549-53.
143. Ray S, Ray M. Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *J Biol Chem* 1981;256:6230-3.
144. Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 1996;27:565-73.
145. Leoncini G. The role of alpha-ketoaldehydes in biological systems. *Ital J Biochem* 1979;28:285-94.
146. Mulac K. Pathomechanismen der Artherosklerose bei Diabetes mellitus., 12 Edn 2005.
147. Desai K, Wu L. Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007;2:89-99.
148. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994;70:138-51.
149. Bourajjaj M, Stehouwer CD, van H, V, Schalkwijk CG. Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1400-2.
150. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:198-202.

9. Literaturverzeichnis

151. Odani H, Shinzato T, Matsumoto Y, Usami J, Maeda K. Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:89-93.
152. Han Y, Randell E, Vasdev S, et al. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2007;305:123-31.
153. McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal Biochem* 1992;206:17-23.
154. Kalapos MP. Methylglyoxal toxicity in mammals. *Toxicol Lett* 1994;73:3-24.
155. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, et al. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1989;7:115-20.
156. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1994;87:21-9.
157. Yamanouchi T, Tachibana Y, Akanuma H, et al. Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am J Physiol* 1992;263:E268-E273.
158. Yamanouchi T, Ogata N, Tagaya T, et al. Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. *Lancet* 1996;347:1514-8.
159. McGill JB, Cole TG, Nowatzke W, et al. Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. *Diabetes Care* 2004;27:1859-65.
160. Fukumura Y, Tajima S, Oshitani S, et al. Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in serum. *Clin Chem* 1994;40:2013-6.
161. Halperin ML, Bear RA, Hannaford MC, Goldstein MB. Selected aspects of the pathophysiology of metabolic acidosis in diabetes mellitus. *Diabetes* 1981;30:781-7.
162. Porter WH, Yao HH, Karounos DG. Laboratory and clinical evaluation of assays for beta-hydroxybutyrate. *Am J Clin Pathol* 1997;107:353-8.
163. Uno S, Ito S, Kurono M, Yamaoka Y, Kamiyama Y, Ozawa K. A simple and sensitive assay for blood ketone bodies using highly purified 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 1987;168:253-5.
164. Kreisberg RA. Diabetic ketoacidosis: new concepts and trends in pathogenesis and treatment. *Ann Intern Med* 1978;88:681-95.
165. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18:896-909.
166. Gormsen H, Lund A. The diagnostic value of postmortem blood glucose determinations in cases of diabetes mellitus. *Forensic Sci Int* 1985;28:103-7.
167. Pecllet C, Picotte P, Jobin F. The use of vitreous humor levels of glucose, lactic acid and blood levels of acetone to establish antemortem hyperglycemia in diabetics. *Forensic Sci Int* 1994;65:1-6.
168. Sulway MJ, Malins JM. Acetone in diabetic ketoacidosis. *Lancet* 1970;2:736-40.
169. Astles R, Williams CP, Sedor F. Stability of plasma lactate in vitro in the presence of antiglycolytic agents. *Clin Chem* 1994;40:1327-30.
170. Liss E, Bechtel S. Improvement of glucose preservation in blood samples. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:689-90.
171. Rick W. *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 5.Auflage, Springer Verlag. 1977.
172. Müller. in Madea, Musshoff: *Rechtsmedizin*. Springer Verlag, Berlin. 2005.
173. Thomas L. Blutglucose. In: *Labor und Diagnose*, Herausgeber: Thomas, L, 5.Auflage, TH Books Verlagsgesellschaft mbH. 1998.
174. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
175. Hindle EJ, Rostron GM, Gatt JA. The diagnostic value of glycated haemoglobin levels in post-mortem blood. *Ann Clin Biochem* 1985;22:144-7.

9. Literaturverzeichnis

176. Gouille JP, Lacroix C, Bouige D. Glycated hemoglobin: a useful post-mortem reference marker in determining diabetes. *Forensic Sci Int* 2002;128:44-9.
177. Lemon M, Forrest AR. Fructosamine activity of proteins in serum. *Clin Chem* 1986;32:2101.
178. O'Rahilly S, Burnett MA, Smith RF, Darley JH, Turner RC. Haemolysis affects insulin but not C-peptide immunoassay. *Diabetologia* 1987;30:394-6.
179. Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med* 1996;19:149-60.
180. Duckworth WC, Hamel FG, Bennett R, Ryan MP, Roth RA. Human red blood cell insulin-degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease share antigenic sites and generate identical products from insulin. *J Biol Chem* 1990;265:2984-7.
181. Shi K. Purification and characterization of Insulin-Degrading Enzyme from human erythrocytes. In: Yokono K BSRR, ed., 35 Edn 1996.
182. Sapin R, Ongagna JC, Gasser F, Grucker D. Insulin measurements in haemolysed serum: influence of insulinase inhibitors. *Clin Chim Acta* 1998;274:111-7.
183. Wroblewski VJ, Masnyk M, Khambatta SS, Becker GW. Mechanisms involved in degradation of human insulin by cytosolic fractions of human, monkey, and rat liver. *Diabetes* 1992;41:539-47.
184. Haibach H, Dix JD, Shah JH. Homicide by insulin administration. *J Forensic Sci* 1987;32:208-16.
185. Bray M. The effect of chilling, freezing, and rewarming on the postmortem chemistry of vitreous humor. *J Forensic Sci* 1984;29:404-11.
186. Livesey JH, Hodgkinson SC, Roud HR, Donald RA. Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin Biochem* 1980;13:151-5.
187. Kubasik NP, Ricotta M, Hunter T, Sine HE. Effect of duration and temperature of storage on serum analyte stability: examination of 14 selected radioimmunoassay procedures. *Clin Chem* 1982;28:164-5.
188. Mako ME, Starr JI, Rubenstein AH. Circulating proinsulin in patients with maturity onset diabetes. *Am J Med* 1977;63:865-9.
189. Heding LG. Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients. *Diabetologia* 1972;8:260-6.
190. Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 2002;25:1049-54.
191. Bowsher RR, Lynch RA, Brown-Augsburger P, et al. Sensitive RIA for the specific determination of insulin lispro. *Clin Chem* 1999;45:104-10.
192. Andersen L, Jorgensen PN, Jensen LB, Walsh D. A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Clin Biochem* 2000;33:627-33.
193. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:1897-903.
194. Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem* 2007;79:2518-24.
195. Associated Regional and University Pathologists. Inc. web page@<http://www.arup-lab.com>. 2009.Zugriff Mai 2012.
196. Myrick JE, Gunter EW, Maggio VL, Miller DT, Hannon WH. An improved radioimmunoassay of C-peptide and its application in a multiyear study. *Clin Chem* 1989;35:37-42.
197. Given BD, Ostrega DM, Polonsky KS, Baldwin D, Jr., Kelley RI, Rubenstein AH. Hypoglycemia due to surreptitious injection of insulin. Identification of insulin species by high-performance liquid chromatography. *Diabetes Care* 1991;14:544-7.
198. Fierens C, Thienpont LM, Stockl D, De Leenheer AP. Matrix effect in the quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:936-7.
199. Rogatsky E, Balent B, Goswami G, et al. Sensitive quantitative analysis of C-peptide in human plasma by 2-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay. *Clin Chem* 2006;52:872-9.

9. Literaturverzeichnis

200. Smith S. Stability of samples for insulin, proinsulin and C-peptide. In: Tolliday U SRHACPM, ed., 151 (Suppl.) Edn 1996.
201. Bristow AF, Das RE. WHO international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. *J Biol Stand* 1988;16:179-86.
202. Linco Research, Inc. Human C-peptide ELISA kit. St. Charles, MO: Linco Research, Inc. <http://lincoresearch.com/protocols/ezhcp-20k.html> (accessed 2009). 2009. Zugriff Mai 2012.
203. Rogatsky E, Tomuta V, Cruikshank G, Vele L, Jayatillake H, Stein D. Direct sensitive quantitative IC/MS analysis of C-peptide from human urine by two dimensional reverse phase/reverse phase high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 2006;29:529-37.
204. Fierens C, Thienpont LM, Stockl D, Willekens E, De Leenheer AP. Quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a stable isotopically labelled internal standard. *J Chromatogr A* 2000;896:275-8.
205. Rodriguez-Cabaleiro D, Stockl D, Thienpont LM. Improvement of sample pretreatment prior to analysis of C-peptide in serum by isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:3600-2.
206. Duckworth WC. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev* 1988;9:319-45.
207. Ward WK, Paquette TL, Frank BH, Porte D, Jr. A sensitive radioimmunoassay for human proinsulin, with sequential use of antisera to C-peptide and insulin. *Clin Chem* 1986;32:728-33.
208. Cohen RM, Nakabayashi T, Blix PM, et al. A radioimmunoassay for circulating human proinsulin. *Diabetes* 1985;34:84-91.
209. Bowsher RR, Wolny JD, Frank BH. A rapid and sensitive radioimmunoassay for the measurement of proinsulin in human serum. *Diabetes* 1992;41:1084-90.
210. Dahir FJ, Cook DB, Self CH. Amplified enzyme-linked immunoassay of human proinsulin in serum (detection limit: 0.1 pmol/L). *Clin Chem* 1992;38:227-32.
211. Kjems LL, Roder ME, Dinesen B, Hartling SG, Jorgensen PN, Binder C. Highly sensitive enzyme immunoassay of proinsulin immunoreactivity with use of two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1993;39:2146-50.
212. Chalk JB, Patterson M, Smith MT, Eadie MJ. Correlations between in vitro dissolution, in vivo bioavailability and hypoglycaemic effect of oral glibenclamide. *Eur J Clin Pharmacol* 1986;31:177-82.
213. Abdel-Hamid ME, Suleiman MS, el-Sayed YM, Najib NM, Hasan MM. A rapid high-performance liquid chromatography assay of glibenclamide in serum. *J Clin Pharm Ther* 1989;14:181-8.
214. Drummer OH, Kotsos A, McIntyre IM. A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector. *J Anal Toxicol* 1993;17:225-9.
215. Lo DS, Chao TC, Ng-Ong SE, Yao YJ, Koh TH. Acidic and neutral drugs screen in blood with quantitation using microbore high-performance liquid chromatography-diode array detection and capillary gas chromatography-flame ionization detection. *Forensic Sci Int* 1997;90:205-14.
216. Sener A, Gillet C, Verhelst J, DeBoeck K, Mahler C, Malaisse WJ. Factitious hypoglycaemia documented by a modified assay for the measurement of plasma sulphonylurea. *Diabet Med* 1995;12:433-5.
217. Magni F, Marazzini L, Pereira S, Monti L, Galli KM. Identification of sulfonylureas in serum by electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 2000;282:136-41.
218. Nunez M, Ferguson JE, Machacek D, et al. Detection of hypoglycemic drugs in human urine using micellar electrokinetic chromatography. *Anal Chem* 1995;67:3668-75.
219. Maurer HH, Kratzsch C, Kraemer T, Peters FT, Weber AA. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;773:63-73.
220. Ho EN, Yiu KC, Wan TS, Stewart BD, Watkins KL. Detection of anti-diabetics in equine plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;811:65-73.
221. Thevis M, Geyer H, Schanzer W. Identification of oral antidiabetics and their metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry-a matter for doping control analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:928-36.

9. Literaturverzeichnis

222. Mittelmaier S, Funfrocken M, Fenn D, Berlich R, Pischetsrieder M. Quantification of the six major alpha-dicarbonyl contaminants in peritoneal dialysis fluids by UHPLC/DAD/MSMS. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:1183-93.
223. Hoffmann GF, Sweetman L. O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime-trimethylsilyl ester derivatives for sensitive identification and quantitation of aldehydes, ketones, and oxoacids in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1991;199:237-42.
224. Ohmori S, Mori M SKKM. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 2, Liss, New York. In: Weiner H FTe, ed. 1989.
225. Mugo SM, Bottaro CS. Rapid analysis of alpha-dicarbonyl compounds by laser desorption/ionization mass spectrometry using 9-(3,4-diaminophenyl)acridine (DAA) as a reactive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:1087-93.
226. Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal Biochem* 1996;238:171-8.
227. Peinado J, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. The metabolism of acetone in the pregnant rat. *Biosci Rep* 1986;6:983-9.
228. Selvin E, Rynders GP, Steffes MW. Comparison of two assays for serum 1,5-anhydroglucitol. *Clin Chim Acta* 2011;412:793-5.
229. Fukumura Y, Oshitani S, Ushijima Y, et al. Interference of maltose in Lana AG kit determination of 1,5-anhydroglucitol and how to avoid it. *Clin Chem* 1992;38:2553-4.
230. Niwa T, Dewald L, Sone J, Miyazaki T, Kajita M. Quantification of serum 1,5-anhydroglucitol in uremic and diabetic patients by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Chem* 1994;40:260-4.
231. Tanabe T, Umegae Y, Koyashiki Y, et al. Fully automated flow-injection system for quantifying 1,5-anhydro-D-glucitol in serum. *Clin Chem* 1994;40:2006-12.
232. Tanaka S, Nakamori K, Akanuma H, Yabuuchi M. High performance liquid chromatographic determination of 1,5-anhydroglucitol in human plasma for diagnosis of diabetes mellitus. *Biomed Chromatogr* 1992;6:63-6.
233. Katayama M, Matsuda Y, Kobayashi K, Kaneko S, Ishikawa H. Simultaneous determination of glucose, 1,5-anhydro-d-glucitol and related sugar alcohols in serum by high-performance liquid chromatography with benzoic acid derivatization. *Biomed Chromatogr* 2006;20:440-5.
234. Yamanouchi T, Akanuma Y. Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;24 Suppl:S261-8.:S261-S268.
235. Li S, Heng X, Sheng H, Wang Y, Yu C. Determination of glycemic monitoring marker 1,5-anhydroglucitol in plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;875:459-64.
236. Onorato JM, Langish RA, Shipkova PA, et al. A novel method for the determination of 1,5-anhydroglucitol, a glycemic marker, in human urine utilizing hydrophilic interaction liquid chromatography/MS(3). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;873:144-50.
237. Winter WE. Evaluation of hypoglycemia and hyperglycemia. In Jialal I, Winter WE, Chan DW, eds. *Handbook of Diagnostic Endocrinology*. Washington: AACC Press. 1999.
238. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory tests*. Vol.1. Washington: AACC Press., 3 Edn 2000.
239. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis C, Ashwood E, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1999.
240. Byrne HA, Tieszen KL, Hollis S, Dornan TL, New JP. Evaluation of an electrochemical sensor for measuring blood ketones. *Diabetes Care* 2000;23:500-3.
241. Marliss EB, Ohman JL, Jr., Aoki TT, Kozak GP. Altered redox state obscuring ketoacidosis in diabetic patients with lactic acidosis. *N Engl J Med* 1970;283:978-80.
242. Felby S, Nielsen E. Determination of ketone bodies in postmortem blood by head-space gas chromatography. *Forensic Sci Int* 1994;64:83-8.
243. Schwenk WF, Berg PJ, Beaufre B, Miles JM, Haymond MW. Use of t-butyltrimethylsilylation in the gas chromatographic/mass spectrometric analysis of physiologic compounds found in plasma using electron-impact ionization. *Anal Biochem* 1984;141:101-9.

9. Literaturverzeichnis

244. Miles JM, Schwenk WF, McClean KL, Haymond MW. Determination of ketone body turnover in vivo with stable isotopes, utilizing gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 1984;141:110-5.
245. Des RC, Montgomery JA, Desrochers S, et al. Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1988;173:96-105.
246. Moreau NM, Goupy SM, Antignac JP, et al. Simultaneous measurement of plasma concentrations and ¹³C-enrichment of short-chain fatty acids, lactic acid and ketone bodies by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:395-403.
247. Laun RA, Rapsch B, Abel W, et al. The determination of ketone bodies: preanalytical, analytical and physiological considerations. *Clin Exp Med* 2001;1:201-9.
248. Custer EM, Myers JL, Poffenbarger PL, Schoen I. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma, and whole blood. *Am J Clin Pathol* 1983;80:375-80.
249. Yamazaki M, Ogura Y, Wakasugi C, Mitsukuni Y, Yoshimura M. Sudden death due to diabetic coma in insulin-department diabetes mellitus: an autopsy report. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1997;51:102-10.
250. Lund A. Adrenaline and noradrenaline in post mortem blood. *Med Sci Law* 1964;4:194-7.:194-7.
251. Coe JI. Postmortem chemistry: practical considerations and a review of the literature. *J Forensic Sci* 1974;19:13-32.
252. Warrell D. Oxford textbook of medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University Press. In: Cox T, Firth J, eds. 2003.
253. R.L.Mitchell. The molar ratio of insulin to C peptide. In: A.M.Stanley, ed., 153 Edn 1993.
254. Sturner WQ, Gantner GE. Postmortem vitreous glucose determinations. *J Forensic Sci* 1964;9:485-91.
255. Lundquist O, Osterlin S. Glucose concentration in the vitreous of nondiabetic and diabetic human eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994;232:71-4.
256. Coe JI. Postmortem chemistries on human vitreous humor. *Am J Clin Pathol* 1969;51:741-50.
257. Bray M, Luke JL, Blackbourne BD. Vitreous humor chemistry in deaths associated with rapid chilling and prolonged freshwater immersion. *J Forensic Sci* 1983;28:588-93.
258. Zilg B, Alkass K, Berg S, Druid H. Postmortem identification of hyperglycemia. *Forensic Sci Int* 2009;185:89-95.
259. Coe JI. Postmortem chemistry of blood, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *Leg Med Annu* 1977;1976:55-92.:55-92.
260. F.Traub. Methode zur Erkennung von tödlichen Zuckerstoffwechselstörungen an der Leiche (Diabetes mellitus und Hypoglykämie)., 112 Edn 1969.
261. Sippel H, Mottonen M. Combined glucose and lactate values in vitreous humour for postmortem diagnosis of diabetes mellitus. *Forensic Sci Int* 1982;19:217-22.
262. De Letter EA, Piette MH. Can routinely combined analysis of glucose and lactate in vitreous humour be useful in current forensic practice? *Am J Forensic Med Pathol* 1998;19:335-42.
263. Kleine TO, Baerlocher K, Niederer V, et al. [Diagnostic significance of lactate concentration in CSF in patients with meningitis. *Dtsch Med Wochenschr* 1979;104:553-7.
264. Palmiere C, Sporkert F, Vaucher P, et al. Is the formula of Traub still up to date in antemortem blood glucose level estimation? *Int J Legal Med* 2012;126:407-13.
265. Canfield DV, Chaturvedi AK, Boren HK, Veronneau SJ, White VL. Abnormal glucose levels found in transportation accidents. *Aviat Space Environ Med* 2001;72:813-5.
266. Chen C, Glagov S, Mako M, Rochman H, Rubenstein AH. Post-mortem glycosylated hemoglobin (HbA1c): evidence for a history of diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci* 1983;13:407-10.
267. Osuna E, Garcia-Villora A, Perez-Carceles MD, et al. Vitreous humor fructosamine concentrations in the autopsy diagnosis of diabetes mellitus. *Int J Legal Med* 1999;112:275-9.
268. Vivero G, Vivero-Salmeron G, Perez C, Bedate A, Luna A, Osuna E. Combined determination of glucose and fructosamine in vitreous humor as a post-mortem tool to identify antemortem hyperglycemia. *Rev Diabet Stud* 2008;5:220-4.

9. Literaturverzeichnis

269. Coe JI. Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am J Forensic Med Pathol* 1993;14:91-117.
270. Forrest AR. ACP Broadsheet no 137: April 1993. Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses. *J Clin Pathol* 1993;46:292-6.
271. Karlovsek MZ. Diagnostic values of combined glucose and lactate values in cerebrospinal fluid and vitreous humour--our experiences. *Forensic Sci Int* 2004;146 Suppl:S19-23.:S19-S23.
272. Ritz S, Kaatsch HJ. [Postmortem diagnosis of fatal diabetic metabolic dyscontrol: what is the significance of cerebrospinal fluid and vitreous body total values and HbA1c. *Pathologie* 1990;11:158-65.
273. Kugler J, Oehmichen M. [Studies of glucose metabolism in the cadaver]. *Beitr Gerichtl Med* 1986;44:185-8.:185-8.
274. Kernbach G, Picht S, Brinkmann B, Puschel K. [Initial results of postmortem diagnosis of diabetes mellitus by Hb A1 determination]. *Z Rechtsmed* 1983;90:303-8.
275. Winecker RE, Hammett-Stabler CA, Chapman JF, Roper-Miller JD. HbA1c as a postmortem tool to identify glycemic control. *J Forensic Sci* 2002;47:1373-9.
276. Valenzuela A. Postmortem diagnosis of diabetes mellitus. Quantitation of fructosamine and glycated hemoglobin. *Forensic Sci Int* 1988;38:203-8.
277. Prior TW, Chapman JF, Bankson DD. Sensitivity of serum fructosamine in short term glycemic control. *Ann Clin Lab Sci* 1989;19:107-13.
278. John WG, Scott KW, Hawcroft DM. Glycated haemoglobin and glycated protein and glucose concentrations in necropsy blood samples. *J Clin Pathol* 1988;41:415-8.
279. O.Lindquist. Determination of insulin and glucose post mortem. *Z Rechtsmed* 1975: 75 (4); 275-277.
280. Patel F. Fatal self-induced hyperinsulinaemia: a delayed post-mortem analytical detection. *Med Sci Law* 1992;32:151-9.
281. Lottspeich F EJ. *Bioanalytik (2.Auflage)*. Spektrum, Akademischer Verlag. 2006.
282. Hopfgartner G, Varesio E, Tschappat V, Grivet C, Bourgogne E, Leuthold LA. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom* 2004;39:845-55.
283. Hager JW, Le Blanc JC. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. *J Chromatogr A* 2003;1020:3-9.
284. Hager JW. Recent trends in mass spectrometer development. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:845-50.
285. Poletini A (Hrsg.). *Applications of LC-MS in Toxicology*. Pharmaceutical Press (Grayslake, USA), 2006. ISBN-13: 978-0853696292. 2013.
286. Albermann ME, Musshoff F, Madea B. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal Bioanal Chem* 2010.
287. Peters FT, Drummer O, Musshoff F. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensich-toxikologischen Untersuchungen: Anforderung an die Validierung von Analysensystemen. https://www.gtfch.org/cms/files/GTFCh_Richtlinie_Anhang%20B_Validierung_Version%201.pdf, Zugriff im November 2011.
288. International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Methods: Methodology*; ICH Q2 B. 1996.
289. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 1998;70:882-9.
290. Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;16:249-55.
291. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005;51:2415-8.
292. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int* 2007;165:216-24.

9. Literaturverzeichnis

293. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 1998;70:882-9.
294. Marcovina S, Bowsher RR, Miller WG, et al. Standardization of insulin immunoassays: report of the American Diabetes Association Workgroup. *Clin Chem* 2007;53:711-6.
295. Manley SE, Stratton IM, Clark PM, Luzio SD. Comparison of 11 human insulin assays: implications for clinical investigation and research. *Clin Chem* 2007;53:922-32.
296. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* 2005;77:3579-85.
297. Erin E Chambers, Cristina Legido-Quigley, Norman Smith, Kenneth J Fountain. Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge. 2013. *Bioanalysis*, 5(1) 65-81.
298. Ho EN, Wan TS, Wong AS, Lam KK, Stewart BD. Doping control analysis of insulin and its analogues in equine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011;1218:1139-46.
299. Thomas A, Schanzer W, Delahaut P, Thevis M. Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2009;1:219-27.
300. Dhar A, Desai K, Liu J, Wu L. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: are we getting the true measure? *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:1093-100.
301. Fedoronko M KJ. Kinetik und Mechanismus der Disproportionierung von Methylglyoxal zu Milchsäure., 34 Edn 1971.
302. Handbook of Chemistry and Physics, CRC press, New York. 92nd Edition. 2011.
303. Kampf CJ, Bonn B, Hoffmann T. Development and validation of a selective HPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of glyoxal and methylglyoxal in atmospheric aerosols (PM_{2.5}). *Anal Bioanal Chem* 2011;401:3115-24.
304. Racker E. The mechanism of action of glyoxalase. *J Biol Chem* 1951;190:685-96.
305. Wild R, Ooi L, Srikanth V, Munch G. A quick, convenient and economical method for the reliable determination of methylglyoxal in millimolar concentrations: the N-acetyl-L-cysteine assay. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:2577-81.
306. Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5533-8.
307. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1994;269:32299-305.
308. Ahmed MU, Brinkmann FE, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 1997;324:565-70.
309. Ahmed N, Thornalley PJ. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *Biochem J* 2002;364:15-24.
310. Nagaraj RH, Shipanova IN, Faust FM. Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J Biol Chem* 1996;271:19338-45.
311. Engelbrecht B, Gawlowski T, Poschmann G, Eisenacher M, Meyer HE, Hess C, Tschoepe D, Stühler K, Stratmann B. Proteom-based analysis of intracellular Methylglyoxal accumulation by Glyoxalase 1 knock down in human aortic endothelial cells. Submitted to *Diabetologia*.
312. Engelbrecht B, Stratmann B, Hess C, Tschoepe D, Gawlowski T. Impact of Methylglyoxal on GLUT4 Translocation in L6 Myoblasts. (revised manuscript submitted to *PLoS One*).
313. Fuller ET, Miller MA, Kaylor DW, Janke C. Lantus overdose: case presentation and management options. *J Emerg Med* 2009;36:26-9.
314. Brvar M, Mozina M, Bunc M. Poisoning with insulin glargine. *Clin Toxicol (Phila)* 2005;43:219-20.

9. Literaturverzeichnis

315. Samuels MH, Eckel RH. Massive insulin overdose: detailed studies of free insulin levels and glucose requirements. *J Toxicol Clin Toxicol* 1989;27:157-68.
316. Owens DR, Coates PA, Luzio SD, Tinbergen JP, Kurzhals R. Pharmacokinetics of 125I-labeled insulin glargine (HOE 901) in healthy men: comparison with NPH insulin and the influence of different subcutaneous injection sites. *Diabetes Care* 2000;23:813-9.
317. Lu M, Inboriboon PC. Lantus insulin overdose: a case report. *J Emerg Med* 2011;41:374-7.
318. Warriner D, Debono M, Gandhi RA, Chong E, Creagh F. Acute hepatic injury following treatment of a long-acting insulin analogue overdose necessitating urgent insulin depot excision. *Diabet Med* 2012;29:232-5.
319. Brvar M, Mozina M, Bunc M. Prolonged hypoglycaemia after insulin lispro overdose. *Eur J Emerg Med* 2005;12:234-5.
320. Snorgaard O, Kjems LL, Roder ME, Hartling SG, Dinesen B, Binder C. Proinsulin immunoreactivity in recent-onset IDDM: the significance of insulin antibodies and insulin autoantibodies. *Diabetes Care* 1996;19:146-50.
321. Glatstein M, Garcia-Bournissen F, Scolnik D, Koren G. Sulfonylurea intoxication at a tertiary care paediatric hospital. *Can J Clin Pharmacol* 2010;17:e51-e56.
322. Klonoff DC, Barrett BJ, Nolte MS, Cohen RM, Wyderski R. Hypoglycemia following inadvertent and factitious sulfonylurea overdoses. *Diabetes Care* 1995;18:563-7.
323. Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Dyer KS, Shannon M, Lee S, Powers M. 1997 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med* 1998;16:443-97.
324. AHFS Drug Information. American Hospital Formulary Service Board of the American Society of Health System Pharmacists 68: 2595-2597. 1998.
325. Spiller HA, Villalobos D, Krenzelok EP, et al. Prospective multicenter study of sulfonylurea ingestion in children. *J Pediatr* 1997;131:141-6.
326. Little GL, Boniface KS. Are one or two dangerous? Sulfonylurea exposure in toddlers. *J Emerg Med* 2005;28:305-10.
327. Hussain K, Mundy H, Ynsley-Green A, Champion M. A child presenting with disordered consciousness, hallucinations, screaming episodes and abdominal pain. *Eur J Pediatr* 2002;161:127-9.
328. Szlatenyi CS, Capes KF, Wang RY. Delayed hypoglycemia in a child after ingestion of a single glipizide tablet. *Ann Emerg Med* 1998;31:773-6.
329. McKendry JB. Fatal hypoglycaemic coma from the use of tolbutamide (orinase). *Can Med Assoc J* 1957;76:572-3.
330. Nakayama S, Hirose T, Watada H, Tanaka Y, Kawamori R. Hypoglycemia following a nateglinide overdose in a suicide attempt. *Diabetes Care* 2005;28:227-8.
331. Ikenoue T, Okazaki K, Fujitani S, et al. Effect of a new hypoglycemic agent, A-4166 [(–)-N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-phenylalanine], on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. *Biol Pharm Bull* 1997;20:354-9.
332. Hirshberg B, Skarulis MC, Pucino F, Csako G, Brennan R, Gordon P. Repaglinide-induced factitious hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:475-7.
333. Owens DR. Repaglinide: a new short-acting insulinotropic agent for the treatment of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 1999;29 Suppl 2:30-7.:30-7.
334. Iwamoto Y, Taniguchi T, Nonaka K, et al. Dose-ranging efficacy of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 2010;57:383-94.
335. Furukawa S, Kumagi T, Miyake T, et al. Suicide attempt by an overdose of sitagliptin, an oral hypoglycemic agent: a case report and a review of the literature. *Endocr J* 2012;59:329-33.
336. Januszewski AS, Karschimkus C, Davis KE, O'Neal D, Ward G, Jenkins AJ. Plasma 1,5-anhydroglucitol levels, a measure of short-term glycaemia: assay assessment and lower levels in diabetic vs. non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:e17-e19.
337. Yamanouchi T, Akanuma Y, Toyota T, et al. Comparison of 1,5-anhydroglucitol, HbA1c, and fructosamine for detection of diabetes mellitus. *Diabetes* 1991;40:52-7.

9. Literaturverzeichnis

338. Won JC, Park CY, Park HS, et al. 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84:51-7.
339. Koga M, Murai J, Saito H, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol levels in patients with fulminant type 1 diabetes are lower than those in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2010;43:1265-7.
340. Akanuma Y, Morita M, Fukuzawa N, Yamanouchi T, Akanuma H. Urinary excretion of 1,5-anhydro-D-glucitol accompanying glucose excretion in diabetic patients. *Diabetologia* 1988;31:831-5.
341. Nowatzke W, Sarno MJ, Birch NC, Stickle DF, Eden T, Cole TG. Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer. *Clin Chim Acta* 2004;350:201-9.
342. Gotoh M, Li C, Yatoh M, Iguchi A, Hirooka Y. Serum uric acid concentrations in type 2 diabetes: its significant relationship to serum 1,5-anhydroglucitol concentrations. *Endocr Regul* 2005;39:119-25.
343. Koga M, Murai J, Saito H, et al. 1,5-Anhydroglucitol levels are low irrespective of plasma glucose levels in patients with chronic liver disease. *Ann Clin Biochem* 2011;48:121-5.
344. Koga M, Murai J, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Habitual intake of dairy products influences serum 1,5-anhydroglucitol levels independently of plasma glucose. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:122-5.
345. Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL. Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of community-based data. *Ann Intern Med* 2011;154:303-9.
346. Fujisawa T, Ikegami H, Tsutsui T, et al. Renal tubular function affects glycosuria-related urinary excretion of 1,5-anhydroglucitol. *Diabetes Care* 1999;22:863-4.
347. Connor H, Scarpello JH. An insulinoma presenting with reactive hypoglycaemia. *Postgrad Med J* 1979;55:735-8.
348. Kerr D, Macdonald IA, Heller SR, Tattersall RB. Alcohol causes hypoglycaemic unawareness in healthy volunteers and patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1990;33:216-21.
349. Quester. In: Madea: Rechtsmedizin. Springer Verlag, Berlin. 2007.
350. Frier BM. Hypoglycemia and driving performance. *Diabetes Care* 2000;23:148-50.
351. Schneider S, Beyer J, Sarnighausen HE, et al. [Comparison of hypoglycemia perception and hormonal counterregulation in controlled hypoglycemia. A contribution to diagnosis of hypoglycemia unawareness syndrome in type 1 diabetic patients]. *Dtsch Med Wochenschr* 2000;125:177-81.
352. Gerich JE, Mokan M, Veneman T, Korytkowski M, Mitrakou A. Hypoglycemia unawareness. *Endocr Rev* 1991;12:356-71.
353. Bolli GB. Prevention and treatment of hypoglycaemia unawareness in type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1998;35:183-93.
354. Boyle PJ, Kempers SF, O'Connor AM, Nagy RJ. Brain glucose uptake and unawareness of hypoglycemia in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;333:1726-31.
355. Fanelli C, Pampanelli S, Epifano L, et al. Relative roles of insulin and hypoglycaemia on induction of neuroendocrine responses to, symptoms of, and deterioration of cognitive function in hypoglycaemia in male and female humans. *Diabetologia* 1994;37:797-807.
356. D.Kerr. Drugs and alcohol. in: B. Fier, M. Fisher (Eds.), *Hypoglycemia and Diabetes*, Arnold, London 336. 1993.
357. Marks V, Teale JD. Hypoglycemia: factitious and felonious. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:579-601.
358. Kernbach-Wighton G, Sprung R, Puschel K. On the diagnosis of hypoglycemia in car drivers--including a review of the literature. *Forensic Sci Int* 2001;115:89-94.
359. Farrell v. Stirling. 1976. In: 40 J. Crim. L. 171 (1976) In the Scottish Courts - Comments on Cases.
360. Mcleod v. Mathieson. 1993 S.C.C.R. 488 (Sh.Ct.). In: http://www.lemac.co.uk/resources/guides/Road_Traffic_Prosecution.htm. Zugriff 05.02.2013.
361. Rogers DJ, Stark MM. Driving whilst unfit through drugs. *J Clin Forensic Med* 1999;6:166-7.
362. Bovill D. A case of functional hypoglycaemia--a medico-legal problem. *Br J Psychiatry* 1973;123:353-8.

9. Literaturverzeichnis

363. Watmore vs. Jenkins. http://sixthformlaw.info/02_cases/mod3a/cases_60_gen_def_automatism.htm. Zugriff 05.02.2013
364. Diabetes in Control.com 98 (14). Hypoglycemia a Defense for Manslaughter. <http://www.diabetesincontrol.com/articles/53-diabetes-news/178->. Zugriff am 05.02.2013.
365. DIE ZEIT. 20 (16.05.1957).
366. Hill E. Significance of dextrose and nondextrose reducing substances in post-mortem blood. Arch Pathol 1941; 32: 452-473
367. Osuna E, Vivero G, Conejero J, et al. Postmortem vitreous humor beta-hydroxybutyrate: its utility for the postmortem interpretation of diabetes mellitus. Forensic Sci Int 2005;153:189-95.
368. Wunder C. Systematische Untersuchungen zur Problematik postmortaler Insulin-Instabilität. Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Frankfurt. 2011.
369. M.Muhm. Zur Möglichkeit der postmortalen Diagnose einer exogenen Insulinintoxikation. In: A.Berlanovich, ed., 36 Edn 1991.
370. Winston DC. Suicide via insulin overdose in nondiabetics: the New Mexico experience. Am J Forensic Med Pathol 2000;21:237-40.
371. Shires TK, Braddock KJ, Pulido JS. Insulin in the vitreous of the normal and streptozotocin-induced diabetic rat. Peptides 1992;13:671-5.
372. Thevis M, Thomas A, Schanzer W, Ostman P, Ojanpera I. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. Drug Test Anal 2012;4:53-6.
373. Nowicka J, Skowronek R, Czech E, Kulikowska J, Olszowy Z. Comments on 'Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS' by Thevis et al. Drug Test Anal 2012;10.
374. Sturner WQ, Putnam RS. Suicidal insulin poisoning with nine day survival: recovery in bile at autopsy by radioimmunoassay. J Forensic Sci 1972;17:514-21.
375. Mirsky IA, Podore CJ, . The urinary excretion of insulin by normal and diabetic subjects. J Clin Invest 1948;27:515-9.
376. Thevis M, Thomas A, Schanzer W. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. Mass Spectrom Rev 2008;27:35-50.
377. Kuerzel GU, Shukla U, Scholtz HE, et al. Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. Curr Med Res Opin 2003;19:34-40.
378. Authier F, Danielsen GM, Kouach M, Briand G, Chauvet G. Identification of insulin domains important for binding to and degradation by endosomal acidic insulinase. Endocrinology 2001;142:276-89.
379. Vogl A, Youngwirth SH. The effects of a single dose of 2000 units of protamine zinc insulin taken by a diabetic patient with suicidal intent. N Engl J Med 1949;241:606-9.
380. Shibutani Y, Ogawa C. Suicidal insulin overdose in a type 1 diabetic patient: relation of serum insulin concentrations to the duration of hypoglycemia. J Diabetes Complications 2000;14:60-2.
381. Fasching P, Roden M, Stuhlinger HG, et al. Estimated glucose requirement following massive insulin overdose in a patient with type 1 diabetes. Diabet Med 1994;11:323-5.
382. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Metab Res Rev 1999;15:412-26.
383. Sheikh-Ali M, Karon BS, Basu A, et al. Can serum beta-hydroxybutyrate be used to diagnose diabetic ketoacidosis? Diabetes Care 2008;31:643-7.
384. Umpierrez GE, Watts NB, Phillips LS. Clinical utility of beta-hydroxybutyrate determined by reflectance meter in the management of diabetic ketoacidosis. Diabetes Care 1995;18:137-8.
385. Luzi L, Barrett EJ, Groop LC, Ferrannini E, DeFronzo RA. Metabolic effects of low-dose insulin therapy on glucose metabolism in diabetic ketoacidosis. Diabetes 1988;37:1470-7.
386. Wallace TM, Meston NM, Gardner SG, Matthews DR. The hospital and home use of a 30-second hand-held blood ketone meter: guidelines for clinical practice. Diabet Med 2001;18:640-5.

9. Literaturverzeichnis

387. Stephens JM, Sulway MJ, Watkins PJ. Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetes. *Diabetes* 1971;20:485-9.
388. Iten PX. β -Hydroxybuttersäure, ein Indikator für eine alkoholische Ketoacidose als Todesursache bei unerwartet verstorbenen Alkoholikern. 75. DGRM-Jahrestagung, 24.-28.09.1996, Universität Zürich. In: Meier M BW, ed. 1996.

}