

Grzegorz Buszewicz, Grzegorz Teresiński, Krzysztof Bańka, Roman Mądro

## Ocena przydatności diagnostycznej współczynnika $\beta$ -hydroksymaślan/acetone w sądowo-lekarskiej diagnostyce nagłych zgonów

### Diagnostic usefulness of the $\beta$ -hydroxybutyrate/acetone ratio in medico-legal diagnostics of sudden deaths

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. med. R. Mądro

Wcześniejsze badania wykazały przydatność przesiewowego oznaczenia acetonu jako wstępnego kryterium diagnostycznego w przypadkach zgonów z powodu wyziębnia organizmu, reaktywnej ketozy poalkoholowej (ARKK), cukrzycy, głodzenia oraz niektórych zatruc. W przebiegu alkoholismu, zwłaszcza w przypadkach przewlekłej konsumpcji etanolu, wymienione wyżej stany mogą jednak nie powodować acetonemii mimo obecności znacznych stężeń kwasu  $\beta$ -hydroksymaślowego ( $\beta$ -HBA). W związku z tym, dla potrzeb niniejszej pracy zmodyfikowano metodę oznaczania  $\beta$ -HBA przy użyciu GC-MS-EI, a następnie użyto jej do analizy 47 próbek krwi pobranej ze zwłok osób zmarłych nagle z nieustalonych przyczyn. W 15 przypadkach stwierdzono, że stężenie  $\beta$ -HBA było wyższe od 1000  $\mu\text{mol/l}$ , spośród których u 6-ciu osób stężenie acetonu (Act) było niższe od 250  $\mu\text{mol/l}$ . Uwzględnienie  $\beta$ -HBA jako dodatkowego kryterium diagnostycznego umożliwia więc w niektórych przypadkach wyjaśnienie patomechanizmu przedśmiertnych zaburzeń metabolicznych.

Our previous studies demonstrated the usefulness of screening determinations of acetone as an initial diagnostic criterion in deaths due to hypothermia, alcoholic ketoacidosis, diabetes mellitus, starvation and some poisonings. In alcoholism, particularly in cases of prolonged ethanol consumption, the above-mentioned conditions may not result in acetonemia, despite marked concentrations of  $\beta$ -hydroxybutyrate acid ( $\beta$ -HBA). Therefore, for the purpose of the present study, the method of  $\beta$ -HBA determination was modified using GC-MS-EI and applied to analyze 47 autopsy blood samples of individuals who died suddenly due to unknown causes.

In 15 cases, the concentration of  $\beta$ -HBA was higher than 1000  $\mu\text{mol/l}$ ; in six subjects from this group, the acetone concentration was lower than 250  $\mu\text{mol/l}$ . In some cases, thus, the use of  $\beta$ -HBA as an additional diagnostic criterion allows for explaining the pathomechanism of premortal metabolic disturbances.

Słowa kluczowe:  $\beta$ -hydroksymaślan, acetone, alkoholizm, hipotermia  
Key words:  $\beta$ -hydroxybutyrate, acetone, alcoholism, hypothermia

#### WSTĘP

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że acetonemia  $>250 \mu\text{mol/l}$  stwierdzona podczas analizy krwi w kierunku etanolu (EtOH) metodą chromatografii gazowej może być objawem kwasicy ketonowej poprzedzającej moment zgonu [1]. Wysokie stężenie ciał ketonowych przy niskim stężeniu EtOH uprawdopodobnia ponadto zgon z powodu hipotermii [2-7].

Do tzw. ciał ketonowych, oprócz Act zaliczane są także kwas acetoctowy (Ac-Ac) oraz kwas  $\beta$ -hydroksymaślowy ( $\beta$ -HBA). Ograniczenie postępowania diagnostycznego wyłącznie do oznaczenia Act nie uwzględnia zatem teoretycznie możliwych przypadków, w których wysoka ketonemia wiąże się z podwyższonym stężeniem wyłącznie  $\beta$ -HBA, gdyż życiowo  $\beta$ -HBA pozostaje w równowadze z Ac-Ac zależnej od potencjału oksydoredukcyjnego komór-

ki, który w przypadkach długotrwałej alkoholismii jest przesunięty w kierunku form zredukowanych.

Celem pracy było zatem opracowanie przydatnej dla celów medyczno-sądowych metodyki oznaczania  $\beta$ -HBA oraz ocena jej praktycznej przydatności dla wykrywania przypadków ketonemii bez istotnej acetonemii. Stosowana wcześniej wieloetapowa technika enzymatyczno-chromatograficzna [8] obarczona była bowiem szeregiem wad, a zwłaszcza wąskim zakresem liniowości oznaczalności oraz niedokładnością spowodowaną pośrednim oznaczaniem  $\beta$ -HBA po jego enzymatycznym utlenieniu do acetoctanu (Ac-Ac), a następnie termicznej hydrolizie do Act.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym, który zbierano w okresie zimowym, było 47 prób krwi pobranej ze zwłok osób zmarłych nagle z nieustalonych przyczyn. Krew w ilości ok. 10 ml pobierano z żyły udowej do próbek polipropylenowych o obj. 12 ml, oznaczano w nich stężenia etanolu i acetonu, a następnie próbki zamrażano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Odczynniki: heksan,  $\beta$ -HBA i Ac-Ac lithium salt (Sigma); acetonitryl, octan etylu, kwas 4-metylowalerianowy i HCl (Merck), BSTFA (Supelco).

Oznaczanie  $\beta$ -HBA zmodyfikowaną metodą GC-MS [9]: 100  $\mu\text{l}$  rozmrożonej krwi sekcyjnej pobierano do fiolki polipropylenowej o objętości 12 ml, dodawano 100  $\mu\text{l}$  wzorca wewnętrznego (kwasu 4-metylowalerianowego) oraz 800  $\mu\text{l}$  acetonitrylu, dokładnie mieszano na wortexie i wirovano 10 min/3000 rpm. Supernatant przenoszono do fiolki 12 ml i dodawano 10  $\mu\text{l}$  32% HCl oraz 10 ml dejonizowanej wody, a następnie dwukrotnie ekstrahowano przy użyciu 2 ml octanu etylu. Po ponownym odwirowaniu, fazę organiczną przenoszono do próbki typu Eppendorf i odparowywano do sucha pod strumieniem azotu w temp.  $45^{\circ}\text{C}$ , po czym derywatyzowano przy pomocy 50  $\mu\text{l}$  BSTFA w temp.  $60^{\circ}\text{C}$  przez 15 min. Ekstrakt po derywatyzacji rozcieńczono 10-krotnie heksanem, odwirowano przez 30 s z szybkością 10 000 rpm.

Analizę Act i EtOH we krwi sekcyjnej wykonywano metodą headspace (statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej) za pomocą dozownika Thermo Finnigan HS 2000 oraz chromatografu gazowego Fisons 8160 z detektorem FID.

Analizę  $\beta$ -HBA wykonywano przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego z kwadrupolowym detektorem mas Thermo Finnigan DSQ. Zastosowano jonizację elektronową EI. Rejestrowano całkowity prąd jonowy w zakresie mas 50-650 amu. Parametry pracy chromatografu: temp. komory nastrzykowej

$250^{\circ}\text{C}$ , źródła EI  $280^{\circ}\text{C}$ , linii transferowej  $250^{\circ}\text{C}$ , gaz nośny – hel 1 ml/min. Rozdział wykonywano na kolumnie kapilarnej DB-5 Rxi, 30 m x 0,25 mm x 25  $\mu\text{m}$ .

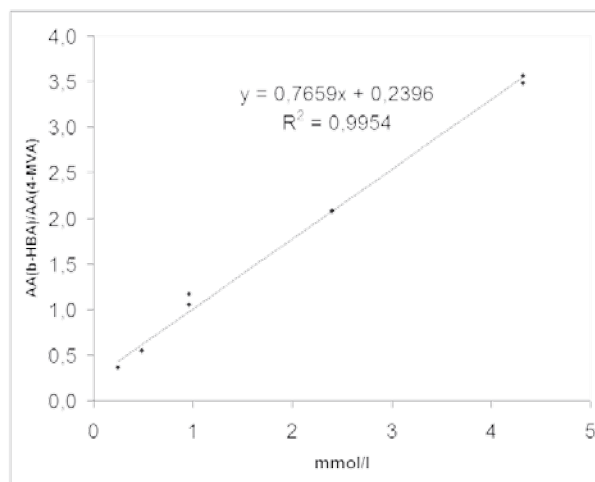
Temperatura początkowa kolumny  $40^{\circ}\text{C}$  była utrzymywana przez 0,1 min, następnie podnoszono ją do  $70^{\circ}\text{C}$  (z szybkością  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) i utrzymywano przez 3,5 min., potem podwyższano ją do temp.  $160^{\circ}\text{C}$  ( $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), a następnie do temp  $280^{\circ}\text{C}$  ( $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) i utrzymywano przez 3 min. Objętość nastrzyki wynosiła 1  $\mu\text{l}$  (splitless 1 min).

## WYNIKI BADAŃ

Liniowość detekcji  $\beta$ -HBA zbadano na 5-ciu punktach pomiarowych w 2 powtórzeniach w zakresie od 240  $\mu\text{mol}/\text{l}$  do 7200  $\mu\text{mol}/\text{l}$  (ryc. 1) i wynosiła  $R^2 = 0,9954$ , zaś powtarzalność (przy  $N = 8$ ) wynosiła  $SD = 23,72 \mu\text{mol}/\text{l}$  przy  $C_{\text{mean}} = 426,68 \mu\text{mol}/\text{l}$ . Granica detekcji wynosiła 0,19  $\mu\text{mol}/\text{l}$ .

Ryc. 1. Krzywa kalibracyjna  $\beta$ -HBA.

Fig.1.  $\beta$ -HBA calibration curve.



W przebadanych 47 próbach krwi, w 15 przypadkach stężenie  $\beta$ -HBA wynosiło  $>1000 \mu\text{mol}/\text{l}$ , a w 6 z nich stężenie Act  $< 250 \mu\text{mol}/\text{l}$ . Przypadki te zestawiono w tabeli 1. Wszystkie te osoby były przewlekłymi alkoholikami z objawami zaawansowanego stłuszczenia lub marskości wątroby<sup>1</sup>, z epizodami picia ciągami w wywiadzie.

<sup>1</sup> U alkoholików w przebadanej grupie przypadków często stwierdzano również objaw pogrubienia opony pajęczek mózgu (jej „zmleczenia”), które naszym zdaniem można traktować jako nowy, nieuwzględniany dotychczas marker zaawansowanej choroby alkoholowej, lecz spostrzeżenie to wymaga weryfikacji w oparciu o szerszy materiał badawczy.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Metoda GC-MS oznaczania  $\beta$ -HBA we krwi sekcijnej okazała się wystarczająco dokładna, precyzyjna i charakteryzująca się szerokim zakresem liniowości detekcji. Ponadto jej czułość znacznie przewyższa metodę enzymatyczno-chromatograficzną. Jest więc w pełni przydatna dla celów sądowo-lekarskich. Przy jej pomocy można także oznaczać (równoległe z  $\beta$ -HBA) Ac-Ac, jednak ze względu na bardzo niską stabilność Ac-Ac w surowicy krwi [10] zrezygnowano z jego oznaczania, gdyż niemożliwe było pobranie próbek wcześniej niż po upływie 1-2 dób od chwili zgonu.

Wśród wyselekcjonowanych 6 przypadków (tabela 1) tylko 2 osoby (przypadek nr 1 i 4) w chwili zgonu znajdowały się w stanie nietrzeźwości, lecz z wywiadu i analizy akt postępowań prokuratorskich wynikało, iż wszystkie osoby spożywały alkohol w ciągu ostatnich 24 godzin przed śmiercią (u ofiar nr 2 i 5 stwierdzono jeszcze niewielkie stężenia etanolu w moczu, a żadne z badanych zwłok nie wykazywały objawów gnicia). Alkoholicy nr 1, 2 i 3 zostali znalezieni w nieogrzewanych pomieszczeniach. Ponadto u wszystkich osób (z wyjątkiem ofiary nr 3, która przeżyła jeszcze 16 h w szpitalu) stwierdzono retencję tzw. kongenerów (metanolu i izopropanolu) alkoholi konsumpcyjnych, które potwierdzały wcześniejszą, najprawdopodobniej długotrwałą konsumpcję alkoholu.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że u osób przewlekłe nadużywających alkoholu może dochodzić do tworzenia znacznych stężeń  $\beta$ -HBA bez jednoczesnego wzrostu stężenia acetonu. Nietrzeźwość prowadzi bowiem do zmiany potencjału oksydoredukcyjnego komórek wątrobowych „zajętych” utlenianiem etanolu i zwiększenia przez to stosunku NADH/NAD, co powoduje hamowanie  $\beta$ -oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych i proce-

su glukoneogenezy (na skutek braku substratu do tej reakcji w postaci pirogronianu, który redukowany jest przez nadmiar NADH do mleczanu). Dochodzi także do redukcji octoocjanu (Ac-Ac) do  $\beta$ -HBA, co z kolei ogranicza spontaniczny rozkład (nieenzymatyczny) Ac-Ac do acetonu.

Ponieważ Ac-Ac i  $\beta$ -HBA tworzy układ red-ox (przy udziale dehydrogenazy  $\beta$ -HBA zależnej od NAD), a pierwszy etap tworzenia ciał ketonowych przebiega praktycznie tylko w wątrobie, dlatego proces ketogenezy może podlegać szczególnemu wpływowi procesów utleniania etanolu i acetaldehydu, które zachodzą również w wątrobie z udziałem tego samego koenzymu.

Omówione wyżej zaburzenia biochemiczne w następstwie nadużywania alkoholu mogą więc powodować zaburzenia fizjologicznych reakcji adaptacyjnych, które chronią organizm przed wyczerpaniem przez produkcję ciał ketonowych. Wiadomo, iż hipotermia prowadzi (podobnie jak inne „stresory”) do uwalniania hormonów o działaniu przeciwnym do insuliny, które nasilają rozpad tłuszczów i produkcję ciał ketonowych stanowiących podstawowe źródło energii dla tkanek po zużyciu zapasów glikogenu na wzmożoną termogenezę w oziębianym organizmie.

Ciała ketonowe swobodnie przechodzą przez błony komórkowe i stanowią łatwo przyswajalny substrat energetyczny, utleniany preferencyjnie przed glukozą i kwasami tłuszczowymi. W stanach hipotermii tkanki zależne od glukozy (jak np. mózg) pokrywają większość swego zapotrzebowania energetycznego ze spalania tych związków, ponieważ bariera krew-mózg jest trudno przepuszczalna dla kwasów tłuszczowych.

Wzrost stosunku NADH/NAD podczas metabolizmu etanolu stymuluje tworzenie przede wszystkim  $\beta$ -HBA, który w odróżnieniu od Ac-Ac nie ulega konwersji do acetonu, co może tłumaczyć przypadki

Tabela I. Przypadki z podwyższonym  $\beta$ -HBA ( $> 1000 \mu\text{mol/l}$ ) przy niskim poziomie Act ( $< 250 \mu\text{mol/l}$ ).  
Table I. Cases with elevated  $\beta$ -HBA ( $> 1000 \mu\text{mol/l}$ ) and low acetone levels ( $< 250 \mu\text{mol/l}$ ).

	Przypadek Case	BAC	UAC	Aceton Acetone	$\beta$ -HBA	$\beta$ -HBA/Aceton $\beta$ -HBA/Acetone
		g/l	g/l	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	
Hipotermia i przewlekły alkoholizm Hypothermia and chronic alcoholism	1	1,77	2,41	109	1004	9
	2	0,00	0,17	117	1225	10
	3	0,00	0,00	103	1134	11
Przewlekły alkoholizm Chronic alcoholism	4	0,98	1,45	15	1032	69
	5	0,32	0,35	113	4857	43
	6	0,00	0,00	223	1351	6

Ryc. 2. Algorytm diagnostyki przedśmiertnych zaburzeń metabolicznych w oparciu o interpretację stężeń  $\beta$ -HBA, acetonu i etanolu. Przerwane linie na wykresie oznaczają konieczność wzięcia pod uwagę alternatywnej drogi postępowania diagnostycznego.

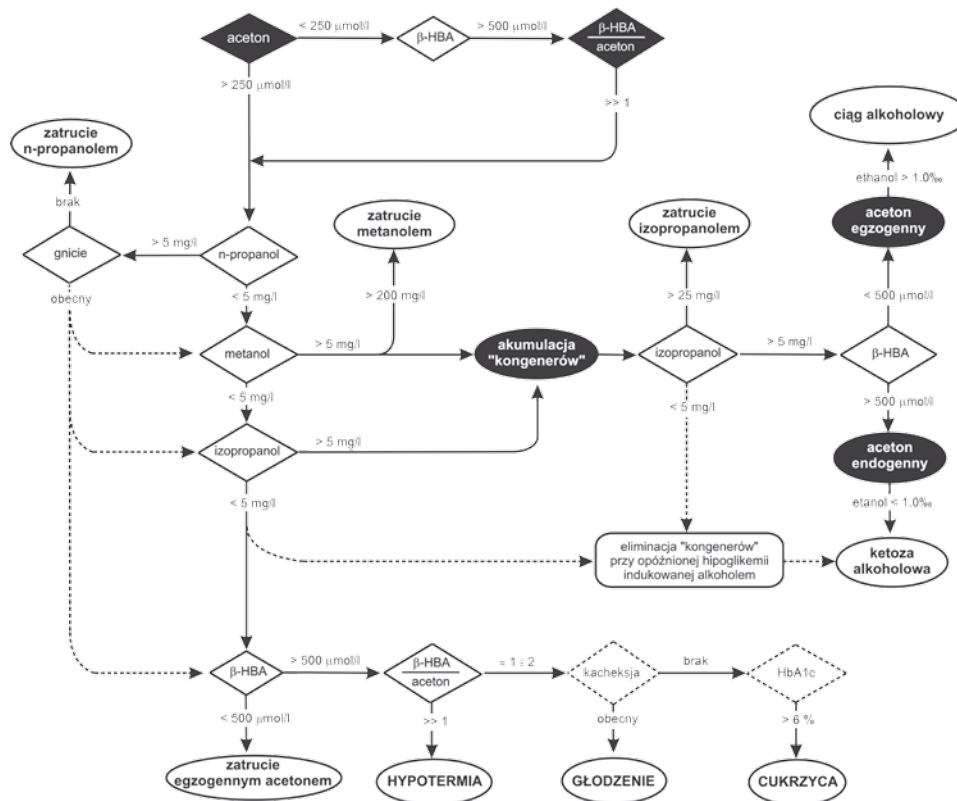
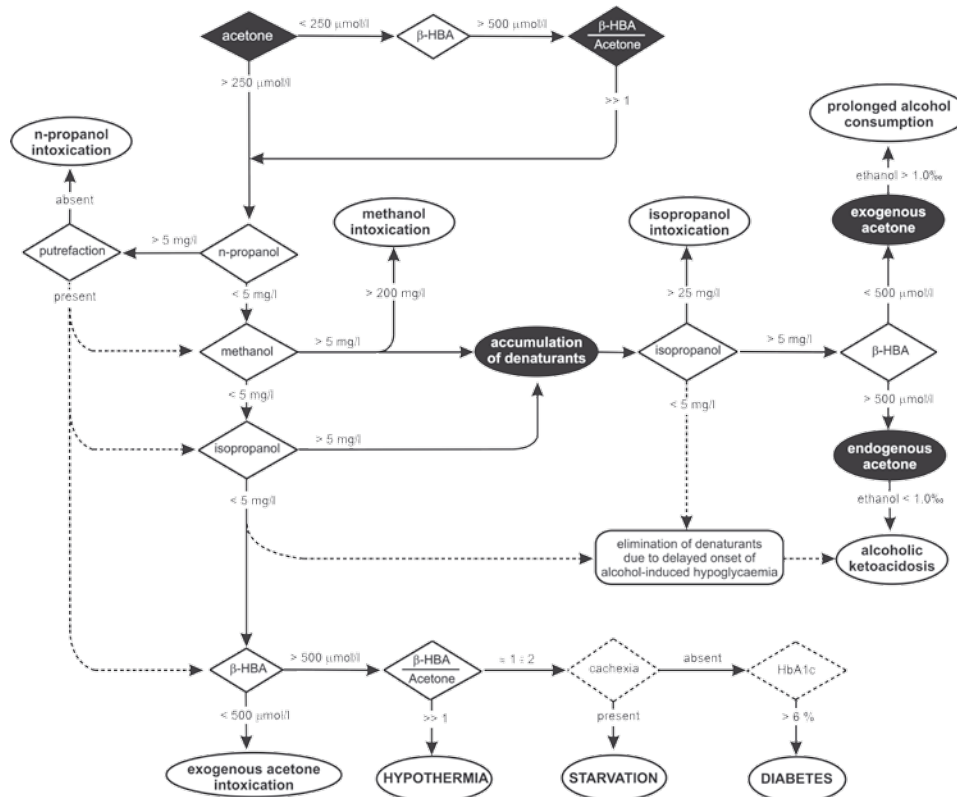


Fig. 2. Algorithm of diagnostics of pre-mortem metabolic disturbances based on interpretation of  $\beta$ -HBA, acetone and ethanol levels. Dotted lines – alternative diagnostic management should be considered.



nawet znacznego stopnia ketonemii bez istotnej acetonemii. Pominięcie  $\beta$ -HBA, jako dodatkowego kryterium diagnostycznego, stwarza więc niebezpieczeństwo pominięcia tych przypadków przedśmiertnych zaburzeń metabolicznych, w których wysoka ketonemia nie jest tożsama z wysokim poziomem acetonemii. Omawiany marker diagnostyczny powinien zatem zostać uwzględniony w algorytmie postępowania diagnostycznego (ryc. 2) patomechanizmów tych zgonów nagłych, którym nie towarzyszą uchwytnie makro- lub mikroskopowe zmiany anatomiczne (np. hipotermii, zespołów odstawienia alkoholu, niektórych zatruc, ostrych powikłań cukrzycy) [11, 12].

## WNIOSKI

1. Czułość, dokładność i precyzja opracowanej metodyki oznaczania  $\beta$ -HBA we krwi za pomocą GC-MS pozwala na wykorzystanie jej do rutynowych badań diagnostycznych w praktyce sądowo-lekarskiej.
2. Zaburzenia potencjału oksydoredukcyjnego komórek w przebiegu alkoholismu (zwłaszcza w przypadkach przewlekłej konsumpcji), mimo znacznych stężeń  $\beta$ -HBA, mogą nie powodować acetonemii.
3. Uwzględnienie  $\beta$ -HBA, jako dodatkowego kryterium diagnostycznego, wyjaśnia patomechanizm przedśmiertnych zaburzeń metabolicznych, których można nie zauważyć stosując proponowany przez nas wcześniej [11, 12] skrining oparty na interpretacji acetonemii wykrytej podczas rutynowego oznaczania etanolu we krwi.

## PIŚMIENNICTWO

1. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R.: Usefulness of  $\beta$ -hydroxybutyric acid, acetoacetate and acetone determinations in blood, urine and vitreous humour for necrochemical diagnosis of premortal metabolic disorders. *Problems of Forensic Sci.* 2000, 44, 55-75.
2. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R.: The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia. *Forensic Sci. Int.* 2002, 127, 88-96.
3. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R.: Biochemical background of ethanol-induced cold susceptibility. *Legal Medicine*, 2005, 7, 15-23.

4. Shneider V., Klug E.: Tod durch Unterkuehlung. *Z. Rechtsmed.*, 1980, 86, 59-69.

5. Hanson P. G., Johnson R. E.: Variation of plasma ketones and free fatty acids during acute cold exposure in man. *J. Appl. Physiol.*, 20, 1966, 56-61.

6. Shephard R. J.: Metabolic adaptations to exercise in the cold: an update. *Sports Med.*, 1993, 16, 266-289.

7. Brinkmann B., Fechner G., Karger B., DuChesne A.: Ketoacidosis and lactic acidosis – frequent causes of death in chronic alcoholics. *Int. J. Legal Med.* 1998, 111, 115-119.

8. Felby S., Nielsen E.: Determination of ketone bodies in postmortem blood by head – space gas chromatography. *Forensic Sci. Int.*, 1994, 64, 83-88.

9. Moreau N. M., Goupy S. M., Antignac J. P., Monteau F. J., Le Bizec B. J., Champ N. M., Martin L. J., Dumon H. J.: Simultaneous measurement of plasma concentrations and  $^{13}\text{C}$ -enrichment of short-chain fatty acids, lactic acid and ketone bodies by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2003, 784, 395-403.

10. Fritzsche I., Buhredel P., Melcher R., Bohme H. J.: Stability of ketone bodies in serum in dependence on storage time and storage temperature. *Clin. Lab.* 2001, 47 (7-8), 399-403.

11. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R.: Przykłady praktycznego zastosowania algorytmu przesiewowego postępowania diagnostycznego podczas badania stanu trzeźwości metodą chromatografii gazowej, materiały XXII Konferencji Toksykologów Sądowych, Popowo 5-6.05. 2005.

12. Buszewicz G., Teresiński G., Mądro R.: A method of tentative evaluation of the probable cause of death in non-traumatic deaths associated with disorders of red-ox balance and ketogenesis, zbiór streszczeń XX Międzynarodowej Konferencji IALM (International Academy of Legal Medicine), Budapeszt 23-25.08.2006, PP-96 (<http://www.forensic-medicine.pl/index.php?option=content&task=view&id=59&Itemid=13&Itemid=26>).

Adres do korespondencji:

Grzegorz Buszewicz  
Zakład Medycyny Sądowej AM w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8  
20-090 Lublin