

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Alkoholkonsummarker im Haar von
Abstinenzlern, Normaltrinkern und Patienten mit chronischem Alkoholabusus im
Vergleich mit traditionellen Biomarkern im Blut

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mara Büchner
aus Münster

Datum der Promotion: 09.12.2016

In Gedenken an Benedict-Emanuel Becks

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Gesellschaftliche Bedeutung des Alkoholmissbrauchs	1
1.2 Problematik des forensischen Nachweises der Alkoholabstinenz und des chronischen Alkoholmissbrauchs	4
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	6
2 Literaturübersicht	7
2.1 Einteilung der Alkoholkonsummarker.....	7
2.2 Klassische, indirekte Labormarker zum Nachweis des Alkoholmissbrauchs	7
2.2.1 Leberenzyme	8
2.2.1.1 Transaminasen	8
2.2.1.2 Gammaglutamyltransferase	9
2.2.2 Mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen	9
2.2.3 Carbohydrate-Deficient Transferrin.....	10
2.3 Haaranalyse zum Nachweis von Alkoholmissbrauch bzw. -abstinenz.....	10
2.3.1 Fettsäureethylester als Alkoholkonsummarker im Haar.....	12

2.3.2	Ethylglucuronid als Alkoholkonsummarker im Haar.....	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Untersuchtes Probandenkollektiv.....	14
3.2	Fragebogen.....	14
3.3	Gewinnung der Blutproben.....	17
3.4	Gewinnung der Haarproben.....	17
3.5	Ausschluss von Probanden aufgrund der Anwendung bestimmter Haarkosmetika	18
3.6	Charakterisierung der Probanden und Haarproben in den Konsumgruppen.....	19
3.7	Statistische Testverfahren.....	21
3.8	Nachweis von Fettsäureethylestern im Haar.....	22
3.8.1	Probenvorbereitung.....	22
3.8.1.1	Reinigung und Segmentierung der Haarproben	22
3.8.1.2	Abtrennung externer Lipide.....	22
3.8.1.3	Haarextraktion.....	23
3.8.1.4	Messvorgang.....	23
3.8.2	Verwendete Methoden.....	26
3.8.2.1	Headspace-Solid Phase Microextraction	26
3.8.2.2	Gaschromatographie.....	28
3.8.2.3	Massenspektrometrie.....	29
3.8.2.4	GC/MS - Auswertung und Methodvalidierung.....	32
3.8.3	Geräte	32
3.8.3.1	Geräte für die Probenvorbereitung.....	32
3.8.3.2	HS-SPME und GC/MS	32
3.8.4	Reagenzien	33
3.8.4.1	Deuterierte Fettsäureethylester.....	33

3.8.4.2	Phosphatpuffer pH 7,6 nach Sørensen	33
3.8.4.3	Sonstige verwendete Chemikalien und Standardsubstanzen	33
3.9	Nachweis von Ethylglucuronid im Haar	34
3.9.1	Probenvorbereitung	34
3.9.2	Bestimmung von Ethylglucuronid	34
4	Ergebnisse	36
4.1	Mittelwerte und Standardabweichungen der Alkoholkonsummarker innerhalb der Konsumgruppen	36
4.2	Falsch positive und falsch negative Ergebnisse für die analysierten Alkoholkonsummarker	37
4.3	ROC-Kurven-Analyse	42
4.4	Kombinierte Interpretation der Haarmarker Ethylglucuronid und Fettsäureethylester	44
4.5	Optimierte Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche für verbesserte Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker	49
4.6	Systematische Fehler durch verschiedene Einflussgrößen in Korrelation mit den untersuchten Markern	51
4.7	Korrelation zwischen den untersuchten Biomarkern	51
5	Diskussion	53
5.1	Mittelwerte und Standardabweichungen der Alkoholkonsummarker innerhalb der Konsumgruppen	53
5.2	Alkoholkonsummarker: falsch positive Ergebnisse bei Fettsäureethylestern und Ethylglucuronid	54
5.3	ROC-Kurven-Analyse	56
5.4	Kombinierte Interpretation der Haarmarker Ethylglucuronid und Fettsäureethylester	59

5.4.1	Proband MB 47	60
5.4.2	Proband MB 78	60
5.4.3	Proband MBK 23	61
5.4.4	Proband MBK 66	61
5.4.5	Proband MBK 72	61
5.4.6	Proband MBK 11	62
5.4.7	Proband MBK 62	62
5.5	Optimierte Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche für verbesserte Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker	62
5.6	Systematische Fehler durch verschiedene Einflussgrößen in Korrelation mit den untersuchten Markern	63
5.7	Pearson-Korrelation zwischen den untersuchten Markern	64
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	65
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	81
8.1	Eidesstattliche Versicherung	81
8.2	Anteilerklärung an den Publikationen	82
8.3	Curriculum Vitae	83
8.4	Publikationsliste	84
9	Danksagung	85

Abstract

Einleitung: Alkoholmissbrauch ist ein medizinisches und gesellschaftliches Problem. Es existiert eine Auswahl an klinisch etablierten Labormarkern zum Nachweis eines Alkoholmissbrauches im Blut. Vor dem Hintergrund rechtlicher Fragestellungen wurden in der Vergangenheit neuere Marker entwickelt, die eine höhere Spezifität für Alkohol besitzen und neben dem Blut auch in anderen Matrices bestimmbar sind. Die Forschung hat sich in den vergangenen Jahren auf die Haaranalyse mit der Bestimmung von Ethylglucuronid (EtG) und Fettsäureethylestern (FSEE) konzentriert.

Zielsetzung: Ziel war die Untersuchung der Leistungsfähigkeit der direkten und indirekten Alkoholkonsummarker zur Diskriminierung der Alkoholkonsumgruppen und zur Grenzwertoptimierung und Prüfung eines Vorteils der kombinierten Betrachtung von FSEE und EtG.

Methodik: In dieser Studie wurden die traditionellen indirekten Blutalkoholkonsummarker Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), Gammaglutamyltransferase (GGT), Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) und mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) mit den direkten, im Haar bestimmten Alkoholkonsummarkern EtG und FSEE von 132 Probanden aus dem klinischen Alkoholentzug und dem sozialen Umfeld der Forschungsgruppe, die in unterschiedliche Konsumgruppen unterteilt wurden, verglichen. Hierfür wurden Blut- und Haarproben gesammelt und mögliche Einflüsse in einem standardisierten Fragebogen dokumentiert. Eine angegebene Trinkmenge von 60 g Ethanol pro Tag und mehr galt als Hinweis auf Alkoholmissbrauch, eine Trinkmenge von mehr als 120 g Ethanol pro Tag als Hinweis auf chronisch-exzessiven Alkoholkonsum. Die gesammelten Daten wurden statistisch ausgewertet. Die Spezifitäten und die Sensitivitäten der Marker wurden bestimmt und die Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Referenzbereiche mittels ROC-Kurven-Analyse ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion: Bis auf MCV zeigten alle Marker eine gute Performance zur Unterscheidung zwischen chronisch exzessivem Alkoholkonsum und normalem, sozial anerkanntem Trinkverhalten bzw. Abstinenz. Fast alle untersuchten Marker wiesen eine deutlich höhere Rate falsch negativer Ergebnisse als falsch positiver Ergebnisse auf. Die besten Ergebnisse und damit Methodenperformances zeigten die Flächen unter der ROC-Kurve für EtG (0,941), GGT (0,943) und CDT (0,899). Die gute Korrelation der Marker ist dem Studiendesign mit einem Abstinenzbeginn vor

Probennahme von weniger als zwei Wochen geschuldet. Die kombinierte Interpretation der Haarmarker ergab eine Sensitivität von 79,6 % für FSEE und EtG. Für die Differenzierung zwischen normalem und chronisch-exzessivem Trinkverhalten wurden die optimalen Grenzwerte bei der Untersuchung des kopfhautnahen 3-cm-Abschnitts der Haarprobe für EtG (28 pg/mg Haar) und FSEE (0,675 ng/mg Haar) berechnet.

Schlussfolgerung: Die vorgelegte Studie zeigt, dass EtG und FSEE den konventionellen Alkoholkonsummarkern bei kurzer Abstinenz nicht unterlegen sind. Die kombinierte Auswertung der Haarmarker kann die Zahl falsch positiver Testergebnisse minimieren. Der von der Society of Hair Testing angegebene Grenzwert zur Detektion chronisch-exzessiven Alkoholkonsums für EtG wurde bestätigt, der Grenzwert für FSEE sollte auf der Basis der Studienergebnisse erhöht werden.

Introduction: A variety of clinically established laboratory markers exist to detect alcohol abuse in blood. Newer markers have been developed which have a higher specificity for alcohol and can use other diagnostic materials. Recent research has focused on hair analysis to determine the level of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEE).

Objective: This study examined the performance of direct and indirect alcohol consumption markers to distinguish between the alcohol consumption groups, and find the optimal detection limits. Additionally, a test based on a combination of FAEE and EtG markers was considered, to examine the advantages of combining these markers.

Methods: 132 candidates were tested to compare the traditional biomarkers in blood (aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), mean corpuscular volume of the erythrocytes (MCV), carbohydrate-deficient-transferrin (CDT)) with the newer direct alcohol consumption markers detectable in hair (EtG, FAEE). The candidates were drawn from an alcohol rehab clinic and the general population, and divided into groups based on their alcohol consumption. Blood and hair samples were collected and possible influences documented in a questionnaire. Amounts of ≥ 60 g of ethanol per day were considered indications of alcohol abuse, with amounts of > 120 g per day indications of chronic excessive alcohol consumption. From the collected data, the markers' specificities and sensitivities were determined. The cut-off values and reference interval limits were determined by ROC curve analysis.

Results: All markers except MCV showed good performance in distinguishing between chronic excessive alcohol consumption and normal, socially acceptable drinking behavior (including abstinence). Almost all investigated markers showed a significantly higher rate of false-negative than false-positive results. EtG (0.941), GGT (0.943) and CDT (0.899) showed the best results regarding to the area under the curve calculated from ROC. The good correlation of the markers is due to the study design, which included an abstinence period of less than two weeks before the beginning of sample collection. The combined interpretation of hair markers yielded a sensitivity of 79.6 % for FAEE and EtG. To differentiate between normal and chronic excessive drinking behavior, the optimal limits for EtG (28 pg/mg) and FAEE (0.675 ng/mg) were calculated using scalp-proximal 3-cm hair samples.

Conclusion: This study shows that EtG and FAEE are equivalent to conventional alcohol consumption markers when testing after short periods of abstinence. Combined

use of these hair markers can minimize the number of false-positive test results. The limit of detection for chronic excessive alcohol consumption specified by the Society of Hair Testing has been confirmed for EtG. However, based on the results of this study, the limit for FAEE should be increased.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl aufgeklärter Fälle der unter Alkoholeinfluss verübten Straftaten in Deutschland 2000-2011.....	2
Abbildung 2: Strukturformel EtG.....	11
Abbildung 3: Strukturformel FSEE.....	11
Abbildung 4: Fragebogen.....	16
Abbildung 5: Geschlechterverteilung in Gruppe eins (Abstinenzler und Normaltrinker) und Gruppe zwei (Alkoholentzugspatienten).....	19
Abbildung 6: GC-MS-SIM-Chromatogramm von FSEE im Haar von Abstinenzlern nach Hastedt et al.....	25
Abbildung 7: GC-MS-SIM-Chromatogramm von FSEE im Haar von Patienten mit chronischem Alkoholabusus nach Hastedt et al.....	26
Abbildung 8: Prinzip der HS-SPME.....	28
Abbildung 9: Prinzip der MS.....	31
Abbildung 10: Darstellung der falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse der Biomarker anhand der in der Einleitung beschriebenen Cut-off-Grenzen und Referenzbereiche.....	41
Abbildung 11: ROC-Kurven der 7 Biomarker.....	42
Abbildung 12: Sensitivität der einzelnen Biomarker in den Haaren und im Blut.....	44
Abbildung 13: Darstellung der Personen (Normaltrinker und Alkoholentzugspatienten) zu den 16 verschiedenen Gruppen des obigen Schemas.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alkoholunfälle im Straßenverkehr im Jahr 2010.....	2
Tabelle 2: Übersicht über die indirekten Labormarker.....	8
Tabelle 3: Einteilung in Konsumprofile nach der Menge an konsumiertem Ethanol pro Tag.....	20
Tabelle 4: Einteilung des Alkoholkonsums in Gruppe eins anhand der Angabe über den Konsum in den letzten 14 Tagen vor der Probenentnahme.....	20
Tabelle 5: Einteilung des Alkoholkonsums in Gruppe zwei anhand der Angabe über den Konsum in den letzten 14 Tagen vor der Probenentnahme.....	21
Tabelle 6: Retentionszeiten und zur Detektion der Fettsäureethylester verwendete (m/z) Werte.....	25
Tabelle 7: Geschätzte Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen anhand der DIN 32645.....	32
Tabelle 8: Gerundete arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen für die Alkoholkonsummarker, unterteilt nach der Trinkmenge.....	36
Tabelle 9: Referenzbereiche der einzelnen Biomarker.....	37
Tabelle 10: Falsch positive und falsch negative Ergebnisse der einzelnen Biomarker unter Anwendung der verschiedenen Grenzwerte (insgesamt 132 Probanden).....	38
Tabelle 11: Einteilung des Alkoholkonsums der Abstinenzler (n = 9) und Normaltrinker (n = 69): richtige und falsche Fallzuordnungen der Biomarker.....	39
Tabelle 12: Einteilung des Alkoholkonsums der Alkoholentzugspatienten (n = 54): richtige und falsche Fallzuordnungen der Biomarker.....	39
Tabelle 13: Flächen unter den ROC-Kurven berechnet anhand der in der Literatur vorgegebenen Obergrenzen der Normbereiche und Cut-off-Werte (der Wert für EtG entspricht dabei dem in der ROC-Kurven-Analyse ermittelten optimierten Grenzwert).....	43
Tabelle 14: Kombinierte Interpretation der FSEE- und der EtG-Konzentrationen in den kopfhautnahen 3-cm-Abschnitten der Haarproben zur Feststellung	

von Alkoholmissbrauch entsprechend Pragst et al. (2010), unter Anwendung der aktuellen Cut-off-Werte von 0,5 ng/mg für FSEE und 30 pg/mg für EtG laut SoHT.....	45
Tabelle 15: Genaue Betrachtung der Normaltrinker mit falsch positiven EtG- und FSEE-Ergebnissen.....	48
Tabelle 16: Genaue Betrachtung der 5 Probanden mit chronischem Alkoholabusus mit falsch negativen EtG- und FSEE-Ergebnissen.....	49
Tabelle 17: Darstellung der optimierten Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker im Blut durch Veränderung der Cut-off-Werte bzw. der Obergrenzen der Normbereiche.....	50
Tabelle 18: Pearson-Korrelationen zwischen den Markern und den Einflussgrößen.....	51
Tabelle 19: Pearson-Korrelation zwischen den Markern.....	52

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
AUC	Fläche unter der Kurve
BMI	Body-Mass-Index
C	Konzentration
CDT	Carbohydrate-Deficient Transferrin
cm	Zentimeter
DHS	Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtG	Ethylglucuronid
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
FAEE	fatty acid ethyl ester
FAS	fetales Alkoholsyndrom
fl	Femtoliter
FSEE	Fettsäureethylester
FSEE sum	Summenwert der Fettsäureethylesterkonzentration von Myristat, Palmitat, Oleat und Stearat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GGT	Gammaglutamyltransferase
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HS-SPME	Headspace-Festphasen-Mikroextraktion
ISBRA	International Society for Biomedical Research on Alcoholism
IU	international unit
LC	Flüssigchromatographie

LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
M	Mittelwert
MCV	mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PDMS-DVB-Copolymer	Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene Copolymer
pg	Pikogramm
psi	Pound-force per Square Inch
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungskurve
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rw	Reststandardabweichung
SD	Standardabweichung
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIM	Selected Ion Monitoring
SoHT	Society of Hair Testing
U/L	units per liter
U	erweiterte Messunsicherheit
% v/v	Volumenprozent
WHO	World Health Organization
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Gesellschaftliche Bedeutung des Alkoholmissbrauchs

Der Alkoholkonsum je Einwohner in Deutschland betrug im Jahr 2010 9,6 Liter (48). Verglichen mit dem Alkoholkonsum der vergangenen Jahre ist der Pro-Kopf-Konsum zwar zurückgegangen (im Vergleich zum Vorjahr um 1 %), die Gesundheitsschädigungen und die damit einhergehenden gesellschaftlichen und sozialen Probleme sind jedoch immer noch erheblich. Im Jahr 2011 konsumierten laut Drogen- und Suchtbericht über 9,5 Millionen Menschen in Deutschland Alkohol in riskanter Form. Etwa 1,3 Millionen galten als alkoholabhängig. Eine Folge davon ist, dass mehr als 73000 Menschen in Deutschland jährlich ihr Leben aufgrund erhöhten Alkoholkonsums verlieren. Gefährliches Trinken bezeichnet die Aufnahme von 60 bis 120 g Ethanol pro Tag. Als exzessiver Alkoholkonsum wird die Aufnahme von mehr als 120 g Ethanol pro Tag bezeichnet (106). An Bedeutung zugenommen hat in den vergangenen Jahren bei Jugendlichen das sogenannte Rauschtrinken oder „Komasaufen“, bei dem fünf oder mehr Konsumeinheiten Alkohol in rascher Folge getrunken werden. Dies betrifft ca. jeden fünften männlichen Jugendlichen (19,6 %). Im Alter von 18 bis 25 Jahren sind es sogar 41,9 % (17).

Der gefährliche Einfluss von Alkohol zeigt sich in der Gesellschaft in verschiedenen Bereichen. Im Jahr 2011 wurden beispielsweise 47165 aller aufgeklärten Straftaten (31,8 %) in Deutschland unter Alkoholeinfluss begangen. Hervorzuheben ist die schwere und gefährliche Körperverletzung. Denn mehr als drei von zehn Tätern eines Gewaltdeliktens standen zur Tatzeit unter Alkoholeinfluss (32).

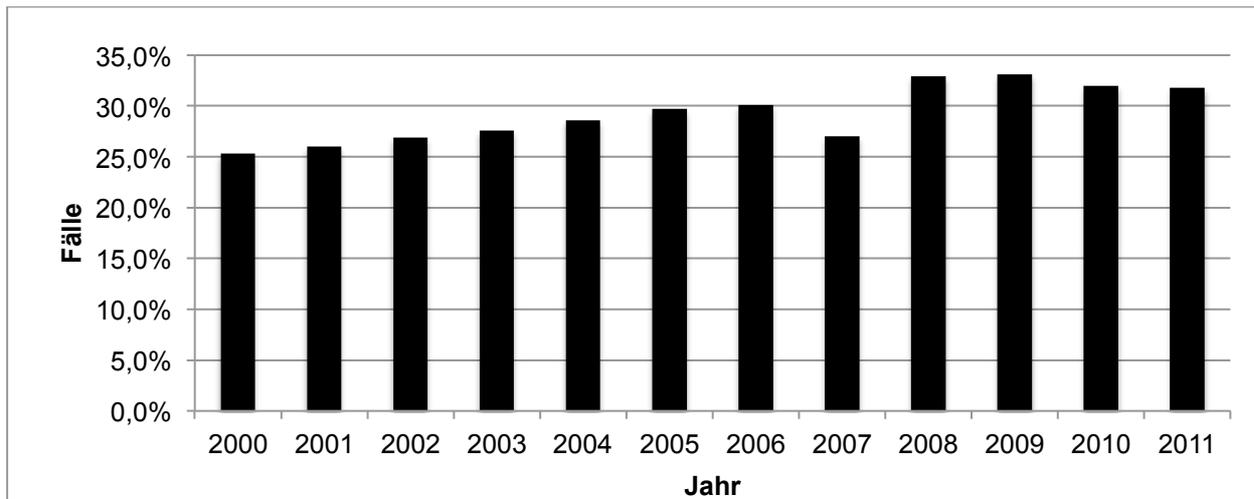


Abbildung 1: Anzahl aufgeklärter Fälle der unter Alkoholeinfluss verübten Straftaten in Deutschland 2000-2011 (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31)

Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist die Anzahl der aufgeklärten und unter Alkoholeinfluss verübten Straftaten von 25,3 % im Jahr 2000 bis auf 30,6 % im Jahr 2006 stetig gestiegen. Im Jahr 2007 gab es erstmalig einen Rückgang der Fälle um 3,6 % auf 27 %. In den beiden darauffolgenden Jahren gab es jedoch wieder einen Anstieg auf 32,9 % (2008) und auf 33,1 % (2009). Seit 2010 ist ein leichter Rückgang zu verzeichnen (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

Auch im Straßenverkehr ist der Konsum von Alkohol ein enormes Problem. Im Jahr 2010 wurden von der Polizei in Deutschland beispielsweise 39345 Unfälle registriert, bei denen mindestens ein Beteiligter unter Alkoholeinfluss stand. 15070 Unfälle, was fast 40 % entspricht, gingen mit einem Personenschaden einher (121).

Tabelle 1: Alkoholunfälle im Straßenverkehr im Jahr 2010

Gegenstand des Nachweises	Anzahl 2010
Alkoholunfälle insgesamt	39345
<u>davon</u>	
Unfälle mit Personenschaden	15070
<u>darunter</u>	
Leichtverletzte	13873
Schwerverletzte	5001
Getötete	342

Spitzenreiter unter den alkoholisierten Verkehrsteilnehmern sind die Personenkraftfahrer, gefolgt von den Fahrradfahrern und den motorisierten Zweiradfahrern. Gleichzeitig sind es in jeder Altersgruppe hauptsächlich Männer, die an Alkoholunfällen mit Personenschäden beteiligt sind (121).

Unter Alkoholeinfluss stehende Frauen fielen zwar im Straßenverkehr deutlich seltener auf, jedoch leiden in Deutschland jährlich etwa 10000 Kinder an den Folgen des Alkoholkonsums ihrer Mütter während der Schwangerschaft. Jährlich kommen in der Bundesrepublik Deutschland etwa 4000 Neugeborene mit einem fetalen Alkoholsyndrom (FAS), welches zu 100 % vermeidbar wäre, zur Welt (16).

Alkohol ist außerdem die Ursache für das Erleiden einer alkoholischen Lebererkrankung oder einer alkoholischen Pankreatitis. Beides sind Erkrankungen, die ohne Alkoholkonsum definitionsgemäß nicht existieren würden. Aber dies sind nur zwei der von Rehm et al. 2010 aufgelisteten Erkrankungen, für die der Konsum alkoholischer Getränke verantwortlich ist (110).

Der gesundheitsschädigende Konsum von Alkohol ist auch auf nationaler und internationaler Ebene ein Thema, welches die World Health Organization (WHO) beschäftigt. Es wird in vielen Ländern nach Strategien gesucht, wie man nicht nur den Alkoholkonsum an sich, sondern auch die damit verbundenen Kosten, welche im Jahr 2003 auf 125 Milliarden US-Dollar in der Europäischen Union (EU) geschätzt wurden, und die weitreichenden sozialen und gesundheitlichen Folgen senken kann (10). In Deutschland allein betrug die Summe der direkten und indirekten Kosten der alkoholbezogenen Krankheiten laut gesundheitsökonomischer Schätzung im Jahr 2007 26,7 Milliarden Euro (41). In der EU wird im Verhältnis zur restlichen Welt am meisten Alkohol konsumiert. Zusätzlich liegt die Prävalenz des starken, episodischen Trinkens mittlerweile bei mehr als einem Fünftel der erwachsenen Bevölkerung (128).

Aufgrund dieser Darstellung und des erheblichen negativen Einflusses von Alkohol auf den Menschen ist es für die forensische Diagnostik wichtig, objektive biologische Marker zu etablieren. Mit diesen sollte es möglich sein, das Ausmaß des Alkoholmissbrauchs frühzeitig zu erkennen und schnellstmöglich die schlimmeren, weitreichenden Folgen weitestgehend zu verhindern und zusätzlich die Behandlungskosten zu senken.

1.2 Problematik des forensischen Nachweises der Alkoholabstinenz und des chronischen Alkoholmissbrauchs

Die aktuelle Blutalkoholkonzentration ist heutzutage sicher, schnell und weitgehend automatisiert direkt bestimmbar (84). Liegt der Konsum von Alkohol eine Weile zurück oder soll ein chronischer Alkoholmissbrauch oder aber eine Alkoholabstinenz über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden, ist dies bis heute erschwert. Aktuell greift man bei diesen Fragestellungen meistens auf die Bestimmung der indirekten Marker im Blut zurück: die Enzymaktivität der Aspartataminotransferase (AST), die Enzymaktivität der Alaninaminotransferase (ALT), das mittlere korpuskuläre Erythrozyteneinzelvolumen (MCV), die Enzymaktivität der Gammaglutamyltransferase (GGT) und das Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) (1, 2, 10, 44, 65, 81, 95). Das Zeitfenster für die Bestimmung dieser Marker bzw. ihrer Enzymaktivitäten ist jedoch nach dem Abstinenzbeginn sehr begrenzt. Zudem existiert für diese Marker bis heute kein Standardprotokoll, nach dem man vorgeht. Auch wurden keine spezifischen allgemein gültigen Obergrenzen der Normbereiche festgelegt (85, 100). Die Werte bzw. Enzymaktivitäten der indirekten Marker verändern sich bei chronischem Alkoholmissbrauch entweder reversibel oder irreversibel durch Organschädigung und somit ist sowohl deren Sensitivität als auch Spezifität eher gering. Keinesfalls möglich ist es aber, anhand dieser Werte bzw. Enzymaktivitäten zwischen einem mäßigen Alkoholkonsum und einer Alkoholabstinenz zu unterscheiden. Ihre geringe Spezifität und Sensitivität ist dadurch begründet, dass die Organschädigungen und die damit einhergehenden Veränderungen der oben genannten Biomarker bzw. ihrer Enzymaktivitäten auch durch verschiedene andere Einflüsse hervorgerufen werden können. Hier sei z. B. an den Einfluss von leberzellschädigenden Medikamenten sowie beispielsweise entzündlichen Erkrankungen der Leber wie Hepatitis erinnert (100, 132). Zusätzlich spielen auch Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index (BMI) eine beeinflussende Rolle, da auch durch sie eine gewisse Werte- bzw. Enzymaktivitätsvariabilität hervorgerufen wird (35). Einige Autoren haben gezeigt, dass sich durch eine Kombination der verschiedenen indirekten Marker eine Erhöhung der Sensitivität erzielen lässt. Dies gilt z. B. für die Kombination von GGT und CDT (8, 9, 21, 33, 62, 100, 125).

In den letzten zehn Jahren etablierten sich besonders zwei der direkten Alkoholkonsummarker im Haar zum Nachweis exzessiven Alkoholkonsums: Ethylglucuronid (EtG) und Fettsäureethylester (FSEE) (97, 101, 103, 107, 108). Nach

derzeitigem Kenntnisstand weisen diese direkten Alkoholkonsummarker eine höhere Spezifität und Sensitivität als die indirekten Marker auf (90, 100, 124). Zudem sind Haarproben relativ leicht und quasi nichtinvasiv zu entnehmen und gut zu asservieren. Diese Marker geben Informationen über den Alkoholkonsum der letzten Monate (104) und nicht nur der letzten Tage oder Wochen. Ihr Nachweis ist nicht durch Medikamente oder organische Erkrankungen des Patienten beeinflussbar.

Die Arbeitsgruppe um Morini zeigte 2009 in einem Kollektiv von 98 Probanden, dass Alter, Geschlecht, BMI, Raucher- bzw. Nichtraucherstatus sowie andere Faktoren wie Haarfarbe, Haarkosmetik und die Anzahl der Haarwäschen pro Woche die Werte für EtG nicht signifikant beeinflussen (92). Dem steht eine andere Studie entgegen, die ein Jahr später belegte, dass das Bleichen der Haare einen Einfluss auf den EtG-Wert hat (94). Die Werte von FSEE im Haar sind durch Haarkosmetik sowie Berufe, bei denen man Alkohol in der Luft ausgesetzt ist, beeinflussbar (15, 39, 47, 52, 76). Es wurde vorgeschlagen, EtG vorrangig zu untersuchen und FSEE als Bestätigung bzw. Entkräftung zur EtG-Untersuchung heranzuziehen.

Für EtG wurde, im Gegensatz zu den herkömmlichen indirekten Markern, nach langer Diskussion (11, 19, 77, 102, 108, 130, 131) auch ein Cut-off-Wert von 30 pg/mg festgelegt. Ein EtG-Wert von 30 pg/mg oder mehr suggeriert einen chronisch exzessiven Alkoholkonsum (76). Auch für FSEE wurde 2009 von der Society of Hair Testing (SoHT) ein Cut-off-Wert zur Unterscheidung zwischen Normaltrinkern und exzessivem, chronischem Alkoholkonsum von 0,5 ng/mg für die Summe aus den vier FSEE (Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat) festgelegt (75). Beide Werte gelten für Kopfhaar und den kopfhautnahen 3-cm-Abschnitt der Haarprobe (37).

Es gibt bisher einige Studien, gerade in der Verkehrsmedizin, welche die Anwendbarkeit von EtG und FSEE getestet haben (85, 86). Bis heute rangieren die beiden Haarmarker nicht exakt gleich, sodass weiterhin im Vergleich beider Marker falsch positive und falsch negative Werte auftreten. Hierbei scheint EtG zurzeit der Marker mit der höheren Spezifität zu sein. Aktuell untermauert ein positiver FSEE-Wert den positiven Wert des EtG. Ein negativer FSEE-Wert kann jedoch keinesfalls den positiven EtG-Wert entkräften (6, 85, 106, 108, 134).

Zusammenfassend zeigt dies, dass für einen aussagekräftigen und objektiven Nachweis des Alkoholmissbrauchs bzw. der Alkoholabstinenz direkte Alkoholkonsummarker von Vorteil sind und zu genaueren Aussagen als die Untersuchung traditioneller, indirekter Biomarker im Blut führen können. Hier ist

eventuell die Kombination der beiden Haarmarker von Bedeutung, um Einflussgrößen und Störfaktoren auf ein Minimum zu reduzieren (76, 106).

1.3 Zielstellung der Arbeit

In der vorgelegten Studie sollen die klassischen konventionellen, indirekten Alkoholkonsummarker AST, ALT, GGT, MCV und CDT im Blut mit den direkten Alkoholkonsummarkern FSEE und EtG im Haar bei einem größeren Probandenkollektiv aus dem klinischen Alkoholentzug sowie Abstinenzlern und Normaltrinkern bestimmt und anhand der von den Probanden angegebenen Trinkmengen zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit der Marker zur Diskriminierung der Alkoholkonsumgruppen verglichen werden. Zugleich sollen anhand des untersuchten Probandenkollektivs eine Grenzwertoptimierung vorgenommen, neue Entscheidungsgrenzen festgelegt und der Vorteil einer kombinierten Betrachtung der Haarmarker geprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Einteilung der Alkoholkonsummarker

Unter den laborchemischen Markern, die auf einen erhöhten Alkoholkonsum hinweisen, werden zwei große Gruppen unterschieden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um indirekte Marker, deren pathologisch veränderte Werte bzw. Enzymaktivitäten meist erst im fortgeschrittenen Stadium durch den geschädigten Metabolismus des Körpers und die durch ihn induzierten Organschädigungen entstehen (85). Diese werden von den direkten Markern differenziert, die als Folge des direkten Metabolismus des konsumierten Alkohols und seiner Stoffwechselprodukte entstehen (73, 93, 100, 106, 123).

2.2 Klassische, indirekte Labormarker zum Nachweis des Alkoholmissbrauchs

Bis zur heutigen Zeit sind es in der klinischen Routine hauptsächlich die indirekten Marker, welche zum klassischen Nachweis des Alkoholmissbrauchs verwendet werden. Diese verändern sich durch den Einfluss des Alkohols sowohl auf das erythropoetische System als auch auf den Stoffwechsel der Leber. Die Werte bzw. Enzymaktivitäten lassen sich aus dem Blut, meist Serum oder Plasma, eines durch übermäßigen Alkoholkonsum geschädigten Körpers bestimmen. Der Metabolismus ist so weit geschädigt, dass sich die Werte von MCV und CDT sowie die Leberenzymaktivitäten von AST, ALT und GGT durch verschiedene biochemische Vorgänge pathologisch verändern (13, 68). Die bedeutende Gemeinsamkeit dieser Marker liegt darin, dass sie alle mehr oder weniger sensitiv und spezifisch einen chronischen Missbrauch des Alkohols anzeigen. Der einmalige Missbrauch bzw. das heutzutage als „Komasaufen“ bezeichnete einmalige Trinken einer erheblichen Menge an Alkohol bleibt hier jedoch verborgen (68). Auch lange zurückliegender Alkoholkonsum ist durch diese Marker nicht nachweisbar.

Tabelle 2: Übersicht über die indirekten Labormarker

Name	Abkürzung
Aspartataminotransferase	AST
Alaninaminotransferase	ALT
Gammaglutamyltransferase	GGT
Carbohydrate-Deficient Transferrin	CDT
Mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen	MCV

2.2.1 Leberenzyme

2.2.1.1 Transaminasen

Die AST und die ALT sind Enzyme, die sowohl in der Leber als auch in anderen Organen des Körpers lokalisiert sind. Die AST kommt in Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Leberzellen hauptsächlich intramitochondrial vor. Im Zytoplasma von Leberzellen findet man überwiegend die ALT (126).

Diese beiden Enzyme sind Katalysatoren einer reversiblen chemischen Reaktion, in der aus α -Ketosäuren durch eine Aminogruppenübertragung eine Aminosäure entsteht (126).

Der Referenzbereich der AST, bei 37 °C, liegt bei Frauen bis 35 U/L und bei Männern bis 50 U/L. Etwas niedriger ist der Bereich bei der ALT, bei Frauen bis 34 U/L und bei Männern bis 45 U/L (62).

Aufgrund der zumindest teilweisen Lokalisation beider Enzyme in der Leber dienen ihre Enzymaktivitäten seit vielen Jahren als indirekte Marker zum Nachweis eines chronischen Alkoholmissbrauchs (83, 109). Erhöhte Enzymaktivitäten nach exzessivem Alkoholkonsum lassen sich in einem Zeitraum von bis zu drei Wochen nachweisen (68). Ein einmaliges exzessives Trinkverhalten spiegelt sich jedoch nicht in einer Erhöhung wider (43). Zudem sind in der Diagnostik von exzessivem Alkoholkonsum die Enzymaktivitäten der Lebertransaminasen weniger sensitiv als die Enzymaktivität der GGT (36, 60).

Durch die intramitochondriale Lokalisation der AST bedarf es einer schwerwiegenderen Schädigung der Leber, um die Enzymaktivität im Serum zu erhöhen, als bei der zytoplasmatisch lokalisierten ALT. Da sowohl erhöhte Enzymaktivitäten der AST als auch der ALT nur indirekt durch Zellschädigung entstehen, gibt es eine Vielzahl von Ursachen, die zu ihrer Erhöhung führen können. Neben dem chronischen

Alkoholabusus kommen z. B. eine Stauungsleber oder eine Fettleber sowie im Falle der AST eine progressive Muskeldystrophie oder aber auch ein Herzinfarkt in Frage. Auch bei Medikamenteneinnahme, chronischen Hepatitiden und einer Leberzirrhose sind die Enzymaktivitäten oft pathologisch erhöht (117, 126). Somit ist es bis heute unter alleiniger Zuhilfenahme dieser Marker nicht sicher möglich, einen erhöhten Alkoholkonsum von einem der obenstehenden anderen verursachenden Faktoren zu differenzieren. Weiterhin kann anhand der Enzymaktivität der AST/ALT bei einem an Hepatitis leidenden Patienten weder ein übermäßiger Alkoholkonsum noch eine Alkoholabstinenz nachgewiesen werden.

2.2.1.2 Gammaglutamyltransferase

Einer der empfindlichsten und bisher ältesten Indikatoren für chronischen Alkoholmissbrauch ist die GGT (111). Dieses Glykoproteinenzym liegt membrangebunden in der Leber vor. Die Höhe der Enzymaktivität ist relativ proportional zum Umfang der Leberzellschädigung, obgleich sich auch bei diesem Marker keine Veränderung der Enzymaktivität bei einmaligem exzessivem Trinken zeigt (68, 117, 116). Erst bei Alkoholkonsum von 80-200 g Ethanol pro Tag über eine oder mehrere Wochen ist eine erhöhte Enzymaktivität nachweisbar. Die Halbwertszeit im Blut beträgt ca. zwei bis drei Wochen (117). Ursächlich für pathologische Werte der Enzymaktivitäten, die bei Frauen oberhalb von 38 U/L und bei Männern über 55 U/L liegen, sind z. B. intra- und extrahepatische Cholestase, Cholangitis, Lebertumoren, Diabetes mellitus, Pankreatitis sowie die toxische Schädigung der Leber durch Alkohol oder die Einnahme von Medikamenten (Barbiturate, Antiepileptika oder Antikoagulantien). Da bei der GGT also ebenfalls viele andere Faktoren ursächlich für die Leberzellschädigung und die damit einhergehende Erhöhung der Enzymaktivität sein können, dient auch dieser Marker nicht als spezifischer Marker für chronischen Alkoholkonsum bzw. für Abstinenz (36, 117, 119, 126).

2.2.2 Mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen

Das MCV wird seit vielen Jahren als einer der indirekten Marker zur Bestimmung von exzessivem Alkoholkonsum verwendet (35, 68). Der Referenzbereich liegt bei Erwachsenen meist zwischen 80 und 96 fl. Im Fall von chronischem Alkoholkonsum kann das MCV erhöht sein. Dann spricht man von einer Makrozytose (> 96 fl) (126). Aufgrund der langen Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen ändert sich der

Wert jedoch erst nach einigen Monaten exzessiven Alkoholkonsums (55). Zudem reichen auch einzelne Alkoholexzesse nicht für die Veränderung des Wertes aus (89, 126). Gleichzeitig gibt es eine große Anzahl von Einflussfaktoren, die dafür sorgen, dass das MCV auch ohne einen übermäßigen Alkoholkonsum über den angegebenen Referenzbereich hinaus ansteigt. Hier sind z. B. HIV-Infektionen, Vitamin-B12- und Folsäuremangel, eine Hypothyreose oder Medikamente als Ursachen zu nennen (70, 117).

2.2.3 Carbohydrate-Deficient Transferrin

Bis heute ist das CDT, welches in der Leber gebildet wird, die laborchemisch bestimmbare Kenngröße des chronischen Alkoholmissbrauchs mit der höchsten Spezifität.

Nach einem täglichen Alkoholkonsum von mindestens 50-80 g Ethanol an mindestens fünf aufeinanderfolgenden Tagen findet man eine erhöhte Serumkonzentration des CDT (85). Es setzt sich aus einer Gruppe von Transferrin-Isoformen zusammen, die nach Abstinenz mit einer Halbwertszeit von ca. 14 Tagen in den Normalbereich abfallen (117).

Erhöhte Werte der Serumkonzentration findet man jedoch nicht nur nach Alkoholabusus, sondern auch als Folge einer katabolen Stoffwechsellage bei Frauen oder unter Antiepileptikaeinnahme. Auch genetische Transferrin-D-Varianten können falsch positive Laborbefunde bedingen (117). Im Jahr 2012 wiesen Bakhireva et al. nach, was auch schon andere Autoren vor ihnen vermuteten: dass auch bei schwangeren Frauen das CDT erhöht sein kann und es so zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (18). Trotzdem liegt die diagnostische Spezifität häufig über 90 % und die diagnostische Sensitivität bei 30-50 % für Frauen und sogar bei 50-70 % für Männer (13, 122, 126).

2.3 Haaranalyse zum Nachweis von Alkoholmissbrauch bzw. -abstinenz

1995 wurde die SoHT gegründet. Diese hat bis heute eine Vielzahl von Leitfäden über die Analyse von Haaren veröffentlicht (37). Haare haben eine starke und stabile Struktur, die gegenüber den traditionellen Markern im Blut den Vorteil hat, dass die Ingestion von Substanzen wie z. B. Drogen, Medikamenten und Alkohol über Wochen bis Monate nachweisbar bleibt (37). Es existiert mittlerweile eine große Anzahl verschiedener Alkoholkonsummarker, die sich im Haar mit differenter Sensitivität und

Spezifität bestimmen lassen und sowohl aus klinischer als auch forensischer Sicht an Bedeutung gewinnen (3, 5, 6, 19, 37, 73, 78, 79, 82, 90, 92, 106, 108, 124). FSEE und EtG sind als die aktuell bewährtesten und hinsichtlich der Aussage zum Alkoholkonsum effektivsten direkten Metaboliten des Alkoholstoffwechsels zu nennen. Sie enthalten beide noch die Ethylgruppe des Ethanols (siehe Abbildung 2 und 3) (104, 108, 134). Nicht möglich ist es, Ethanol direkt in der Haarmatrix zu bestimmen, wie das bereits im Blut oder im Atem möglich ist, da dies die Volatilität sowie die Exposition äußerer, verfälschender Einflüsse verbietet (76). Der klare Vorteil von FSEE und EtG im Gegensatz zu den herkömmlichen Markern liegt in der Möglichkeit, zeitlich zurückliegenden Alkoholkonsum zu detektieren.

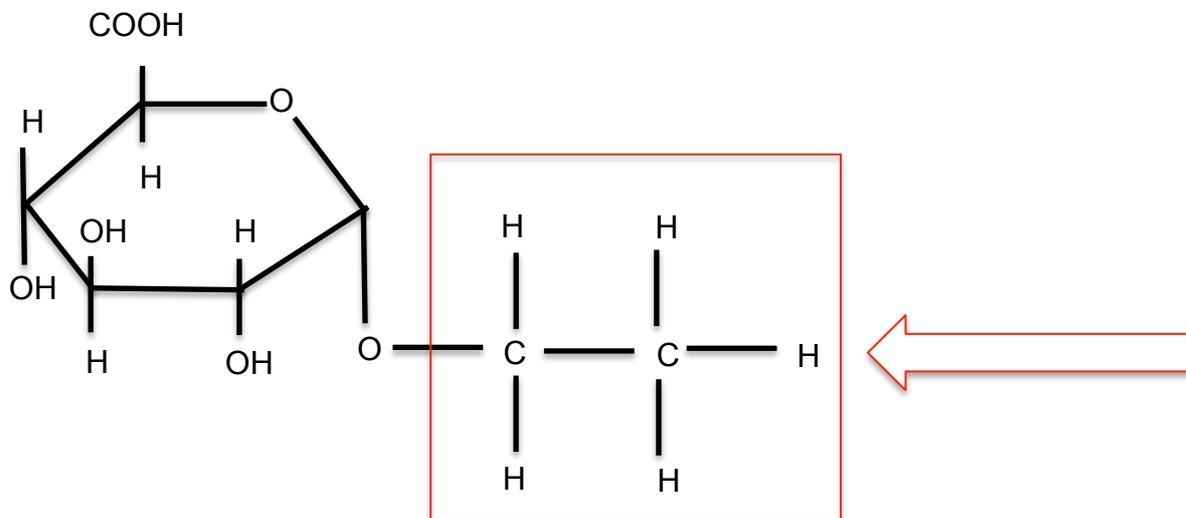


Abbildung 2: Strukturformel EtG

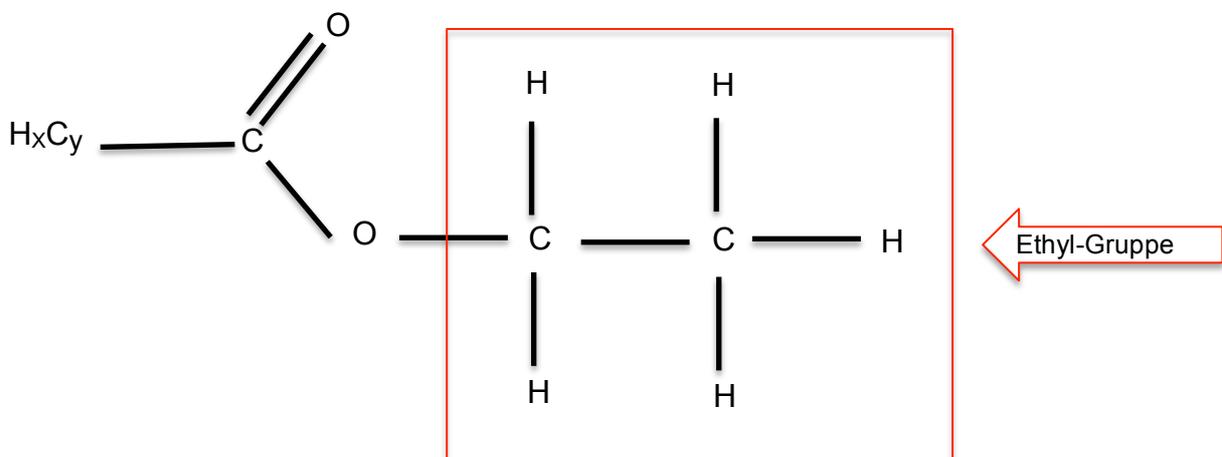


Abbildung 3: Strukturformel FSEE

2.3.1 Fettsäureethylester als Alkoholkonsummarker im Haar

Im Jahr 2000 wurde von Pragst et al. zum ersten Mal vorgeschlagen, Haare auf FSEE als Alkoholkonsummarker zu untersuchen, und dafür eine Methode entwickelt (107). FSEE sind Abbauprodukte von Ethanol, die nach dessen Konsum in den meisten Körpergeweben aus freien Fettsäuren sowie Triglyceriden, Lipoproteinen und Phospholipasen durch spezifische FSEE-Synthetasen und unspezifische Esterasen gebildet werden (108). Es existieren mittlerweile einige Techniken, um die Analyse durchzuführen (20). Etabliert haben sich jedoch angesichts der höchsten Sensitivität die Extraktion mit nichtwässriger n-Heptan-/Dimethylsulfat-Lösung und die darauffolgende Untersuchung mittels Headspace-Festphasen-Mikroextraktion (HS-SPME). Dies wird in Kombination mit der Gaschromatographie (GC) durchgeführt und ist an die Massenspektrometrie (MS) gekoppelt (15, 103). Daher wurden die Haaranalysen auf FSEE in dieser Arbeit ebenfalls mittels dieser Methode vorgenommen.

2.3.2 Ethylglucuronid als Alkoholkonsummarker im Haar

EtG ist ein direktes, aus Glucuronidierung von Ethanol mit Glucuronsäuren entstehendes Stoffwechselprodukt. Dieser Entgiftungsweg macht ca. 0,02-0,06 % der kompletten Elimination von Alkohol im Körper aus (38, 50). 1993 wurde von Sachs die Haaranalyse in Erwägung gezogen und umgesetzt (112). Im Urin wurde EtG bis zu 80 Stunden nach Alkoholaufnahme nachgewiesen (114). Somit liegt ein Vorteil gegenüber dem direkten Ethanolnachweis (maximal 9 Stunden im Urin (34)) in der Nachweisbarkeit des Stoffes auch nach kompletter körperlicher Elimination des Ethanols (115, 132).

Die Haaranalyse zeigte schnell, dass es möglich wurde, exzessive und chronische Alkoholkonsumenten von Normaltrinkern und Abstinenzlern zu unterscheiden (7), da der Konsum nachträglich über Wochen und Monate nachvollzogen werden konnte (71). Weiterhin wurde ein proportionaler Zusammenhang zwischen der täglich aufgenommenen Menge an Alkohol und der Höhe des EtG-Wertes dargestellt, welcher jedoch relativ schwach ist (11, 102). Dabei zu beachten ist die natürliche Wachstumsrate der Haare von ca. 1 cm pro Monat (11). Aktuell stehen Cut-off-Werte zur Differenzierung zwischen Normaltrinkern und Abstinenzlern von 7 pg/mg bzw. zur Abgrenzung zu exzessivem Alkoholkonsum von 30 pg/mg zur Verfügung. Bis heute wurden einige Methoden zur Bestimmung von EtG entwickelt und in der Literatur veröffentlicht. Hier sind der Nachweis mittels Flüssigchromatographie mit

Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS-MS) sowie mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) zu erwähnen (67, 69, 77, 91, 134).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchtes Probandenkollektiv

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte von Beginn an in zwei voneinander getrennten Gruppen. In Gruppe eins wurden zuerst insgesamt 95 Haar- und Blutproben von Abstinenzlern und Normaltrinkern aus dem sozialen Umfeld der Forschungsgruppe gewonnen. Die zunächst 74 Haar- und Blutproben der Probanden der Gruppe zwei, die sich aus ambulanten und stationären Alkoholentzugspatienten zusammensetzt, wurden in der Ambulanz der Nervenlinik der Charité in Berlin-Mitte und im St. Hedwig-Krankenhaus am Tag ihrer Anmeldung in der Klinik entnommen. Ausschlusskriterium war ein mehr als 14 Tage zurückliegender Abstinenzbeginn.

Die gesamte Entnahme der Haar- und der Blutproben geschah auf freiwilliger Basis nach Aufklärung in schriftlicher und mündlicher Form. Zusätzlich wurde eine schriftliche Einwilligungserklärung vorausgesetzt. Die Studie erhielt am 15.09.2005 ein positives Votum der Ethikkommission der Charité mit der Nummer EA4/116/05.

3.2 Fragebogen

Zur Erfassung relevanter Daten der Studienteilnehmer wurde ein Fragebogen entworfen. Alle Probanden wurden zu ihrem täglichen Alkoholkonsum in den zurückliegenden 14 Tagen vor der Probenentnahme bzw. vor Abstinenzbeginn befragt. Dieser Alkoholkonsum wurde in Bier, Wein/Sekt und Schnaps/Likör unterteilt und in Einheiten abgefragt. Eine Einheit Bier entsprach 250 ml, eine Einheit Wein oder Sekt 100 ml und eine Einheit Schnaps oder Likör 20 ml. Zusätzlich wurden die Alkoholentzugspatienten nach vorherigen längeren Abstinenzphasen sowie ihrem allgemeinen Trinkverhalten, beispielsweise „nur am Wochenende“ oder „nur drei Wochen im Monat“, befragt. Außerdem wurden Geburtsdatum, Geschlecht, Körpergewicht und -größe erfragt.

Darüber hinaus wurden das Datum der Probenentnahmen und die Lokalisation (Kopf, Brust, Bein, Achsel) der Haarproben erfasst. Die Probanden wurden dazu angehalten, ihre Haarfarbe anzugeben. Bei der Haarpflege wurde ermittelt, wann die Haare zuletzt gewaschen, gebleicht, gefärbt, getönt oder dauergewellt wurden, wie häufig dies durchgeführt wurde und mit welchen Mitteln. Zudem wurden die Probanden gefragt, ob und ggf. wie häufig sie Haarwasser, Haarfestiger oder andere Stylingprodukte verwenden, wann dies zuletzt geschehen ist und welche Mittel sie dazu benutzt haben.

Am Ende hatten die Probanden anzugeben, ob sie in den letzten sechs Monaten einer starken Sonnenexposition unterlagen und ob sie eher trockene oder fettige Haut besitzen.

FSEE werden als stark lipophile Moleküle über das Sebum in das Haar eingelagert. EtG wird über das Blut in die Haare eingelagert. Als hydrophiles Molekül wird EtG auch über den Schweiß ausgeschieden. Zudem kann aufgenommener Trinkalkohol in geringem Maße auch über den Schweiß ausgeschieden werden. Um mögliche verfälschende Einflüsse durch übermäßiges Schwitzen zu erfassen, wurde die Neigung zum Schwitzen im Fragebogen erfasst und ausgewertet.

Zusätzliche Angaben, etwa zur Einnahme von Medikamenten, wurden unter „sonstige Bemerkungen“ auf dem Fragebogen erfasst.

Die Daten wurden pseudonymisiert - durch Versehen mit fortlaufenden Nummern - in einer Datei erfasst.

CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
 Institut für Rechtsmedizin
Abteilung Forensische Toxikologie
 Turmstrasse 21 (Haus N), 10559 Berlin

Fernruf (030) 450 525031 FAX (030) 450 525904

Forschungsprojekt Fettsäureethylester als Marker für Alkoholmissbrauch

Name: Proband-Nr.
 Geburtsdatum: Geschlecht: männl. / weibl.
 Körpergewicht (kg): Körpergröße (cm):

Längerfristiges Alkoholkonsumverhalten

Zeitraum von/bis	Abstinenz	Konsum	Trinkmengen Ø; Überwiegende Art der Getränke

Angaben zum Alkoholkonsum in der Zeit vor der Probennahme

(1 Einheit Bier = 250 ml; 1 Einheit Wein/Sekt = 100 ml;

1 Einheit Schnaps/Likör = 20 ml)

Tage vor Entnahme	14	13	12	11	10	9	8
Datum							
Einh. Bier							
Einh. Wein/Sekt							
Einh. Schnaps/Likör							

Tage vor Entnahme	7	6	5	4	3	2	1
Datum							
Einh. Bier							
Einh. Wein/Sekt							
Einh. Schnaps/Likör							

Haaprobe:

Entnahmedatum:

Naturhaarfarbe

Hell-blond	Mittel-blond	Dunkel-blond	Braun	Dunkel-braun	Schwarz	Rot	Grau	Weiß	Sonstige

Haarpflege	wann zuletzt	Häufigkeit	Pflegemittel
Haarwäsche			
Bleichung			
Färbung			
Tönung			
Dauerwelle			
Haarwasser			
Festiger/Stylingprodukte			

starke Sonnenexposition letzte 6 Monate	nein	ja
Neigung zum Schwitzen	schwach	stark
Hauttyp	eher trocken	eher fettig

Abbildung 4: Fragebogen

3.3 Gewinnung der Blutproben

Die Gewinnung der Blutproben zur Bestimmung der traditionell verwendeten indirekten Alkoholkonsummarker, wie Transaminasen (AST und ALT), MCV, GGT und CDT, erfolgte innerhalb der Gruppe eins durch eine selbstständig durchgeführte venöse Blutentnahme mit dem herkömmlichen BD Vacutainer® System, mit dem dazu üblicherweise verwendeten BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set mit einer 21G Butterfly Needle. Damit wurde für die Plasmaanalyse ein Plasmaröhrchen für die ALT, die AST und die GGT entnommen. Das in den Plasmaröhrchen befindliche Heparin war auf 17 IU/ml standardisiert. Für die Blutbildanalyse zur Bestimmung des MCV wurde ein Ethylendiamintetraacetat-Röhrchen (EDTA-Röhrchen) verwendet. Für die Serumanalyse zur Bestimmung des CDT wurde Blut in BD Vacutainer® SST™ II Advance Röhrchen mit Silikonpartikeln als Gerinnungsaktivator entnommen.

Bei den Probanden der Gruppe zwei fand im St. Hedwig-Krankenhaus nur eine zusätzliche Blutentnahme für die CDT-Bestimmung statt, wie oben beschrieben. Die übrigen Werte gingen aus der bereits erfolgten standardisierten Laboranalyse bei Aufnahme der Patienten im St. Hedwig-Krankenhaus hervor. Die komplette Blutentnahme in der Nervenklinik der Charité in Berlin-Mitte wurde von dem dortigen Personal durchgeführt. Die Laborwerte mit dem jeweiligen Abnahmedatum wurden im Nachhinein zur Verfügung gestellt. Beide Krankenhäuser verwendeten für die Blutentnahmen die gleichen oben beschriebenen Systeme.

Das Blut der selbstständig durchgeführten Blutentnahmen wurde im Zentralinstitut für Labormedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin nach den aktuell geltenden Standards analysiert und die Ergebnisse wurden zeitnah schriftlich übersandt.

3.4 Gewinnung der Haarproben

Bei der Probenentnahme wurde ein ca. 3-4 mm dickes Bündel Haare im Scheitelbereich des Hinterhauptes des Probanden mit einer Schnur zusammengebunden und mit einer leicht gebogenen Nagelschere etwa 1 mm oberhalb der Kopfhaut abgeschnitten. Anschließend wurde die Schnur in Richtung der Schnittkante geschoben, um diese dadurch zu markieren. Das Haarbündel wurde in Alufolie eingewickelt und bis zur Analyse in einem beschrifteten Briefumschlag dunkel und trocken bei Zimmertemperatur gelagert; in der Regel jedoch nicht länger als vier Wochen, wie von Agius und Kintz empfohlen (4). Dies geschah in beiden Probandengruppen gleichermaßen. Teilweise wurden bei dünnen Haaren, um eine

Beeinträchtigung des Aussehens zu vermeiden, mehrere kleine Bündel anstatt eines großen Bündels auf die oben beschriebene Weise entnommen. Bei Haaren, die kürzer als 3 cm, aber mindestens 2 cm lang waren, wurde die gesamte Länge für die Untersuchung verwendet. Bei längeren Haarproben wurde zur Untersuchung auf FSEE und EtG, wie von der SoHT vorgeschlagen, der kopfhautnahe 3-cm-Abschnitt der Haarprobe verwendet (76). Da Kopfhaar ca. 0,6-1,4 cm im Monat wächst, sind in diesem Haarabschnitt ungefähr die letzten drei Monate vor der Untersuchung repräsentiert (59). Bei Probanden, die kein Kopfhaar besaßen, wurde stattdessen auf Körperbehaarung, wie Brust-, Achsel- oder Beinhaar, zurückgegriffen, was auch dokumentiert wurde. Hier wurde jedoch stets, aufgrund des gegenüber Kopfhaar differenten Wachstumsverhaltens, generell die gesamte Länge verwendet.

3.5 Ausschluss von Probanden aufgrund der Anwendung bestimmter Haarkosmetika

Infolge des bereits mehrfach wissenschaftlich nachgewiesenen Einflusses von haarkosmetischer Behandlung auf die Alkoholkonsummarkerkonzentration im Haar und da von der SoHT und der European Workplace Drug Testing Society (EWDTS) in entsprechenden Richtlinien festgelegt wurde, dass Angaben zur Haarpflege zu erfragen und zu protokollieren sind, wurden anhand der Fragebögen für die statistische Auswertung nur Proben verwendet, bei denen gemäß den von den Probanden getroffenen Angaben keine problematischen Haarbehandlungen durchgeführt worden waren. Ausschlusskriterien waren Färbung oder Bleichung sowie die Verwendung von Haarwachs und alkoholhaltigen Haarpflegeprodukten (39, 47, 52, 94, 105). Nach dieser durchgeführten Bereinigung wurden von den Abstinenzlern und Normaltrinkern 17 Probanden ausgeschlossen, somit verblieben in dieser Gruppe zusammen noch 78 Probanden. Bei den Probanden mit chronisch exzessivem Alkoholkonsum wurden 20 Personen ausgeschlossen, somit blieben insgesamt 54 Probanden in dieser Gruppe. Schließlich bestand das Kollektiv nach dem oben beschriebenen Ausschlussverfahren insgesamt aus 132 Probanden. Alle Proben dieser Probanden gingen in die Auswertung mit ein.

3.6 Charakterisierung der Probanden und Haarproben in den Konsumgruppen

Die Gruppe eins der Abstinenzler und Normaltrinker besteht aus 29 Männern (37,1 %) und 49 Frauen (62,8 %). Unter den Alkoholentzugspatienten in Gruppe zwei befinden sich 45 Männer (83,3 %) und 9 Frauen (16,7 %).

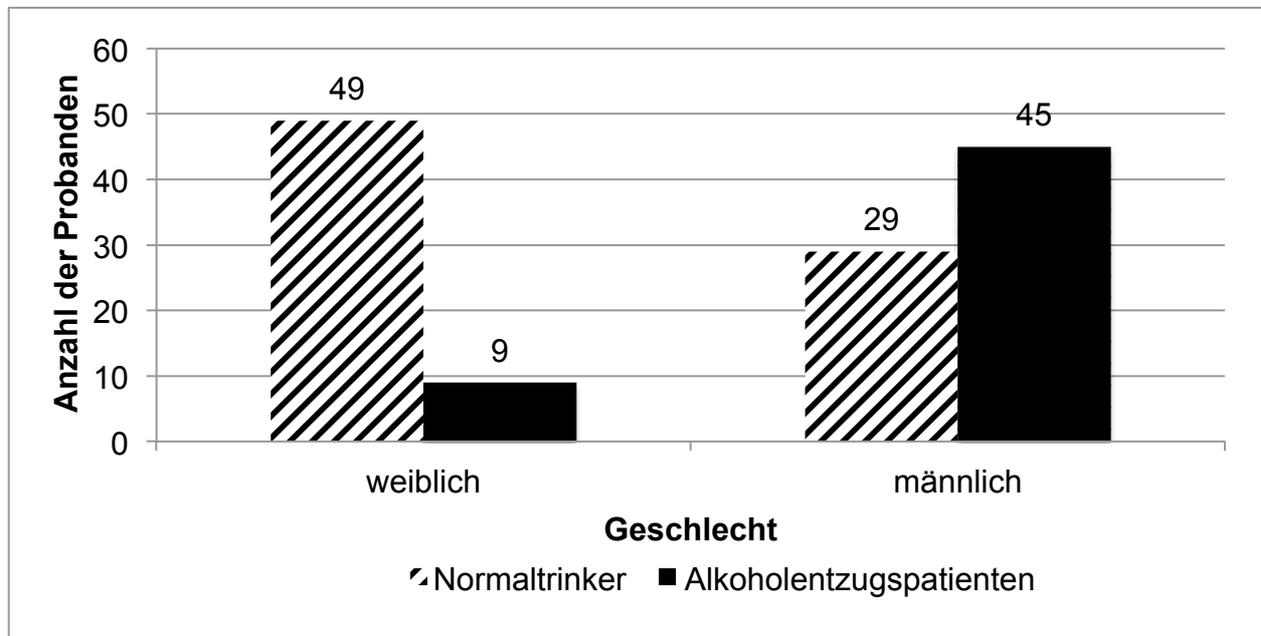


Abbildung 5: Geschlechterverteilung in Gruppe eins (Abstinenzler und Normaltrinker) und Gruppe zwei (Alkoholentzugspatienten)

Neben Haaren vom Kopf wurden in Gruppe eins nur einmalig Brusthaare entnommen. In Gruppe zwei wurden dreimal Brusthaare, einmal Beinhaare und zweimal Achselhaare für die Analyse verwendet.

Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung der Probanden anhand ihres im Fragebogen angegebenen Alkoholkonsums der letzten zwei Wochen vor der Probenentnahme.

Die Alkoholgehalte von Bier, Wein/Sekt und Schnaps/Likör wurden pauschal mit 4 %, 10 % und 50 % (v/v) angenommen; anhand dieser Werte wurde ein durchschnittlicher täglicher Alkoholkonsum in Gramm abgeschätzt. Auf dieser Grundlage wurde eine Einteilung in Konsumprofile vorgenommen. Die Einteilung erfolgte erstens in Abstinenzler, also Probanden, die keinen Alkohol konsumierten. Als Normaltrinker wurden alle Probanden charakterisiert, die zwar Alkohol konsumierten, jedoch weniger als 60 g Ethanol pro Tag zu sich nahmen. Gefährliches Trinken bezeichnet die Aufnahme von 60 bis 120 g Ethanol am Tag. Konsumierte der Proband mehr als 120 g Ethanol pro Tag, so wurde dies als exzessiver Alkoholkonsum benannt (106).

Im Hinblick auf die Angaben der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) wurde eine tägliche Alkoholkonsummenge von 60 g Ethanol oder mehr zur Unterscheidung zwischen Normaltrinkern und Probanden mit kritischem Alkoholkonsum herangezogen. Die DHS bewertet Frauen und Männer unterschiedlich. So wird schon der Konsum von mehr als 40 bis 80 g bei Frauen und von mehr als 60 bis 120 g bei Männern als gefährlich bezeichnet (42).

Tabelle 3: Einteilung in Konsumprofile nach der Menge an konsumiertem Ethanol pro Tag

Ethanolkonsum pro Tag in g	Konsumprofil
0	Abstinenzler
> 0 - < 60	Normaltrinker
≥ 60 - 120	„gefährliches Trinken“
> 120	exzessiver Alkoholkonsum

Es gab 9 Probanden, die keinen Alkohol konsumierten. 69 Probanden galten als Normaltrinker. 25 Probanden wiesen einen gefährlichen Ethanolkonsum von 60-120 g pro Tag auf und 29 Probanden betrieben vor ihrem Entzugsbeginn einen exzessiven Ethanolkonsum von mehr als 120 g pro Tag.

Tabelle 4: Einteilung des Alkoholkonsums in Gruppe eins anhand der Angabe über den Konsum in den letzten 14 Tagen vor der Probenentnahme

	Häufigkeit	Prozent
Abstinenzler (0 g EtOH/Tag)	9	11,5
Normaltrinker (> 0 - < 60 g EtOH/Tag)	69	88,5
Gesamt	78	100,0

Tabelle 5: Einteilung des Alkoholkonsums in Gruppe zwei anhand der Angabe über den Konsum in den letzten 14 Tagen vor der Probenentnahme

	Häufigkeit	Prozent
gefährliches Trinken (≥ 60 -120 g EtOH/Tag)	25	46,3
exzessiver Alkoholkonsum (> 120 g EtOH/Tag)	29	53,7
Gesamt	54	100,0

3.7 Statistische Testverfahren

Die statistischen Untersuchungen wurden mittels der Software SPSS Statistics 20[®] durchgeführt. Die Graphiken wurden entweder ebenfalls mit SPSS Statistics 20[®] oder mittels Microsoft Excel[®] für Mac 2011, Version 14.2.5 erstellt.

Zunächst wurden durch SPSS die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (SD) für die einzelnen Biomarker bestimmt. Hierzu wurden die relativen SD mit der Formel SD/M berechnet. Mit einem T-Test für unabhängige Stichproben wurde untersucht, ob diese Werte auch auf die Grundgesamtheit anwendbar sind. Dies bestätigte sich, da alle ermittelten Werte für die sieben Biomarker einen Signifikanzwert von $< 0,05$ aufwiesen.

Weiterhin wurden zur Untersuchung der Probanden Kreuztabellen erstellt, aus denen man die falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse für die jeweiligen Biomarker ablesen konnte. Dafür wurden die sieben Biomarker anhand von in der Literatur vorliegenden Grenzwerten bzw. der Grenzwerte des Labors, in dem die Analyse durchgeführt wurde, in kategoriale Variablen eingeteilt (pathologisch/nicht pathologisch) (37). Diese Ergebnisse wurden graphisch in einem gruppierten Balkendiagramm dargestellt.

Für verschieden gewählte Cut-off-Werte bzw. verschieden gewählte Obergrenzen der Normbereiche der Alkoholkonsummarker wurden Sensitivität und Spezifität berechnet und hieraus eine Grenzwertoptimierungskurve erstellt.

Zusätzlich wurden für die Biomarker im Blut weiterführend die optimierten Grenzwerte in Abhängigkeit von der Sensitivität und der Spezifität bestimmt. Es galt eine selbst

gewählte Mindestspezifität von 90 % zu erreichen, um die Zahl falsch positiver Ergebnisse zu minimieren.

Um systematische Fehler zu verhindern, wurden Pearson-Korrelationen zwischen den Markern und den Einflussgrößen, jeweils nur unter den Markern und jeweils nur unter den Einflussgrößen, berechnet.

3.8 Nachweis von Fettsäureethylestern im Haar

Die Bestimmung der FSEE-Konzentration wurde mittels HS-SPME-GC/MS nach validierten Methoden durchgeführt (56). Für die FSEE, welche als Summenparameter bewertet werden, lag die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der einzelnen Ester jeweils unter 5 bzw. 20 pg/mg. Die Summe setzte sich aus den vier folgenden Estern zusammen: Ethylpalmitat, Ethylstearat, Ethyloleat und Ethylmyristat.

3.8.1 Probenvorbereitung

Bevor die Haarproben der hochspezifischen Analyse zugeführt werden konnten, mussten sie in mehreren Schritten speziell aufbereitet werden.

3.8.1.1 Reinigung und Segmentierung der Haarproben

Die entnommenen Haarproben wurden zunächst, wenn sie stark verschmutzt oder durch Haarpflegemittel wie Gel oder Spray kontaminiert waren, mit lauwarmem Wasser gespült und anschließend bei Raumtemperatur einen Tag lang luftgetrocknet. Durch die einfache Verwendung von Wasser ohne zusätzliche Lösungsmittel konnte man eventuellen Beeinträchtigungen der Messungen vorbeugen. Bei sauberen Haaren, ohne sichtbare Kontaminierung, wurde von einer Vorbehandlung abgesehen.

Von den entnommenen Haarsträhnen wurden vom vorher gekennzeichneten kopfhautnahen Abschnitt der Haarprobe, je nach Haarlänge, maximal und bestenfalls 3 cm abgetrennt und in die dafür beschrifteten Bechergläser gelegt. In diesen Gläsern wurden die Haarsträhnen mit einer Haarschere der Firma Basler in 2 bis 3 mm lange Stückchen zerkleinert.

3.8.1.2 Abtrennung externer Lipide

Die zerkleinerten Haarfragmente wurden zur Abtrennung oberflächlicher Anhaftungen zunächst in braune 4-ml-Schraubvials vom Typ G4 mit Teflonseptum eingewogen. Die Einwaage lag zwischen 20 und 50 mg und wurde bis auf 0,1 mg genau notiert. Zu den Haaren wurde je 1 ml n-Heptan in das Schraubvial pipettiert. Daraufhin wurde das

Gemisch im Thermomixer für zehn Minuten bei 25 °C und 800 rpm geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde mit einer fein ausgezogenen Pipettenspitze das n-Heptan abpipettiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt.

3.8.1.3 Haarextraktion

Die mit n-Heptan gewaschenen und anschließend getrockneten Haarproben wurden mit 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), 2 ml n-Heptan und 10 µl Standardlösung (d-FSEE, je 2 ng/µl in n-Heptan) versetzt und im Anschluss für 15 Stunden bei 20 °C und 1250 rpm im Thermomixer extrahiert. Nach 15 Stunden wurde die Temperatur auf < 10 °C herabgekühlt. Das DMSO trennt sich ab und erstarrt hierbei.

Die obere Phase, bestehend aus n-Heptan, wurde in einen 10-ml-Headspace-Flakon dekantiert und unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom in einem Heizblock bei 55 °C eingedampft.

Den nach der Extraktion und der Wäsche mit n-Heptan entstandenen Rückständen wurden 1 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,6) und 0,5 g Natriumchlorid (NaCl) zugegeben. Der Sörensen-Puffer stellte einen neutralen pH-Wert her und verhinderte damit die Esterhydrolyse, da die Proben oft lange im Gerät auf ihre Messung warten mussten. Das Gefäß wurde mit einer Verschlusskappe, die ein aus Silikon und Polytetrafluorethylen bestehendes Septum enthält, fest verschlossen. Daraufhin wurde der Behälter an den dafür vorgesehenen Platz im Probennehmer eingesetzt und die Messung mit HS-SPME-GC/MS durchgeführt.

3.8.1.4 Messvorgang

Für die Messungen wurden die folgenden Geräteparameter und Einstellungen angewandt:

HS-SPME:

Nach dem Ausheizen der mit 65 µm dickem Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene Copolymer (PDMS-DVB-Copolymer) beschichteten SPME-Faser (30 Minuten bei 260 °C) wurde die Probe zu Beginn jeder Messsequenz 5 Minuten bei 90 °C vorgeheizt, 30 Minuten unter Schütteln bei 90 °C extrahiert (Schüttelgeschwindigkeit 250 rpm, kontinuierlich jeweils 60 Sekunden schütteln rechts – 30 Sekunden Pause – 60

Sekunden schütteln links – 30 Sekunden Pause) und von der Faser im GC-Injektor bei 260 °C 15 Minuten desorbiert.

GC:

Das Temperaturprogramm des GC-Laufs begann bei 70 °C, die 2 Minuten lang gehalten wurden. Dann wurde die Temperatur um 20 Grad pro Minute bis auf 300 °C erhöht. Diese Temperatur wurde 5 Minuten lang gehalten (Gesamtlaufzeit GC: 18,5 Minuten). Der Trägergasfluss mit Helium 5.0 als Trägergas wurde konstant auf 1 ml/min eingestellt. Die Injektion erfolgte im Splitless-Modus, das Split wurde nach 3 Minuten geöffnet.

MS:

Die Temperaturen der Ionenquelle und des Quadrupols betragen 230 °C und 150 °C. Die Ionisierungsenergie lag bei 70 eV. Die Elektronenmultiplier-Spannung lag 200 mV über der nach Autotune eingestellten Spannung. Mindestens einmal pro Woche wurde ein Autotune durchgeführt.

Das verwendete Quadrupolmassenspektrometer wurde im SIM-Modus mit Zeitfenstern betrieben. Dabei wurden die in Tabelle 6 wiedergegebenen Massenspuren aufgenommen.

In dem verwendeten SIM-Modus werden nur ausgewählte Massen mit höchster Empfindlichkeit aufgezeichnet. Dies ist der Unterschied gegenüber der Scan-Methode, bei der alle Massen in einem bestimmten Bereich ab einer gewissen Signalintensität aufgezeichnet werden.

Tabelle 6: Retentionszeiten und zur Detektion der Fettsäureethylester verwendete (m/z) Werte

Retentionszeit bei 28 m Säulenlänge	Aufgenommene Massenspuren (SIM-Massen)	Zugehöriger FSEE
14,63 min	101*, 256* ¹ , 157* ¹	Ethylmyristat
14,58 min	106*, 261* ¹ , 162* ¹	D5-Ethylmyristat
16,66 min	101*, 284* ¹ , 157* ¹	Ethylpalmitat
16,62 min	106*, 289* ¹ , 162* ¹	D5-Ethylpalmitat
18,27 min	310*, 101* ¹ , 88* ¹	Ethyloleat
18,23 min	315*, 106* ¹ , 93* ¹	D5-Ethyloleat
19,58 min	101*, 312* ¹ , 157* ¹	Ethylstearat
19,54 min	106*, 317* ¹ , 162* ¹	D5-Ethylstearat

* Quantifier

*¹ Qualifier

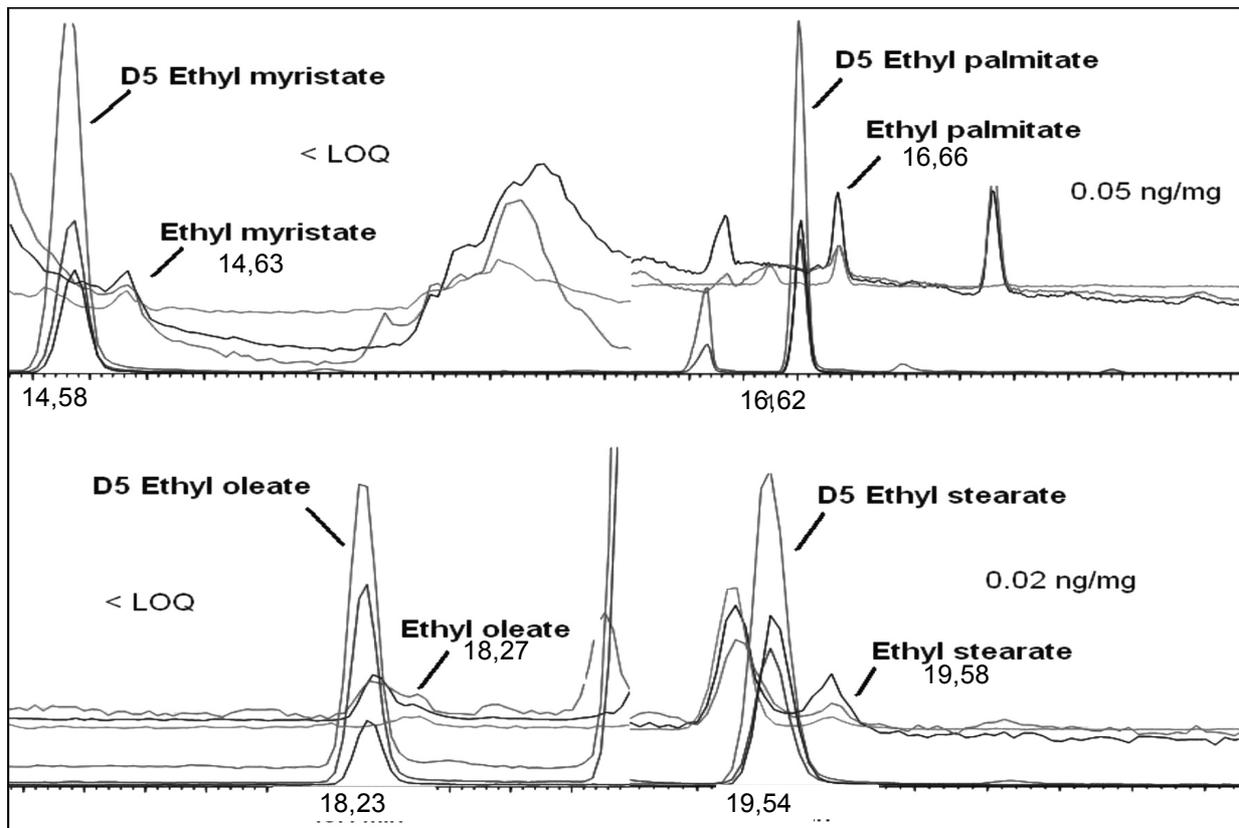


Abbildung 6: GC-MS-SIM-Chromatogramm von FSEE im Haar von Abstinenzlern nach Hastedt et al. (58)

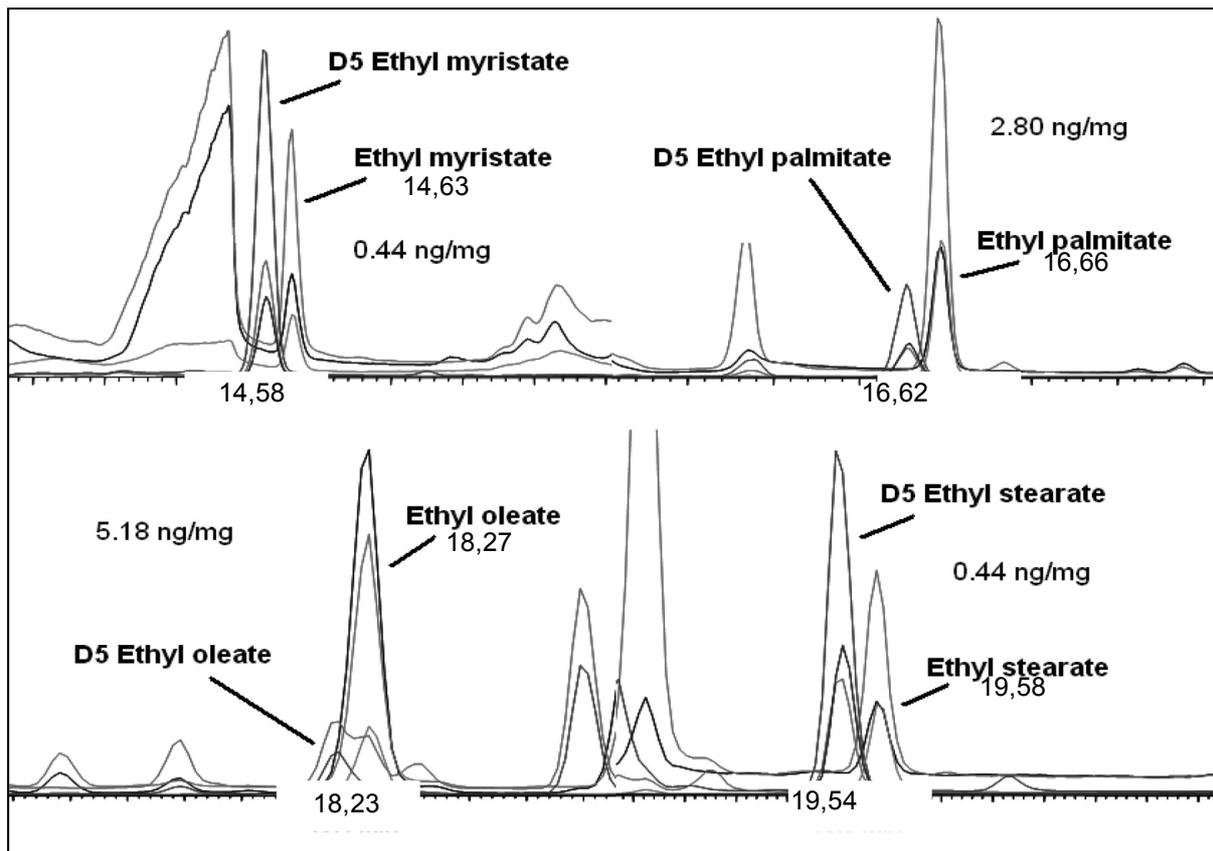


Abbildung 7: GC-MS-SIM-Chromatogramm von FSEE im Haar von Patienten mit chronischem Alkoholabusus nach Hastedt et al. (58)

3.8.2 Verwendete Methoden

Um die sehr geringen Konzentrationen (pg/mg-Bereich) der FSEE im Haar bestimmen zu können, wurde das Verfahren der HS-SPME mit der GC/MS kombiniert. Diese Methode wird in dieser Arbeit in ihren Grundlagen erläutert. Ausführlichere Darstellungen und Erklärungen sind bereits publiziert worden (96, 98, 14, 57). Sowohl zur Kontrolle dieser Methode als auch zur richtigen Quantifizierung der verschiedenen FSEE wurden interne deuterierte Standards verwendet.

3.8.2.1 Headspace-Solid Phase Microextraction

Die HS-SPME ist ein Verfahren, bei dem Stoffe durch Adsorption an der Oberfläche von geeigneten Adsorbentien angereichert werden, um dann in einem weiteren Schritt wieder desorbiert zu werden. Hierbei wird der Dampfraum über der Probe untersucht. Der Probennehmer, eine Edelstahlnadel, trägt eine Quarzfaser oder eine Glasfaser, welche mit dem Adsorbens überzogen ist. Die jeweilige Beschichtung der Fasern und die Schichtdicke (7-100 μm) (96) richten sich nach den chemisch-physikalischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials. Die Quarzfaser wird, geschützt durch

eine sie umhüllende Kanüle, durch das Septum des Probengefäßes gestoßen. Sobald sich die Quarzfaser in dem Gefäß mit der Probe befindet, wird das Adsorbens freigelegt. Je nachdem, welche Substanzen adsorbiert werden sollen, finden bei polaren Substanzen Polyacrylatpolymer und Carbowax Anwendung. Für unpolare Substanzen werden Polydimethylsiloxan oder Ether als Beschichtung verwendet. Die Moleküle aus der Gasphase („Dampfphaseanalyse“) der Probe werden adsorbiert und es stellt sich ein Gleichgewicht ein. Das Konzentrationsverhältnis von Analyten zum deuterierten Standard ist proportional zur Konzentration in der Probe. Sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, wird die Faser in die Kanüle zurückgezogen und die Moleküle des Analyten werden durch die hohe Temperatur im Inlet desorbiert.

Die Proben in dieser Arbeit wurden mit einem Autosampler der Firma Gerstel gemessen.

Durch die Automatisierung dieser Probenvorbereitung bei der HS-SPME-Methode wird eine reproduzierbare Probenverarbeitung ermöglicht, die idealerweise mit der GC/MS kombiniert werden kann. Zusätzlich können sehr kleine Probenmengen untersucht werden, da die gesamte extrahierte Analytenmenge für die Chromatographie verwendet wird.

Vorteilhaft ist die hohe Lebensdauer der Faser. Sie ermöglicht eine große Anzahl von Einzelinjektionen, da sie nach Desorption sofort wieder gebrauchsfähig ist. Sie taucht bei der Methode nicht direkt in das Extrakt ein, so dass die Probenvorbehandlung, z. B. durch Variierung des pH-Wertes, vielfältig gestaltet werden kann, ohne dass es zu einer Schädigung der Faser kommt.

Zu den Nachteilen dieses Verfahrens zählen die teilweise geringe Extraktionsausbeute und dass sowohl Analyten mit extrem niedrigem Dampfdruck als auch ionische Verbindungen nicht erfasst werden (14, 54).

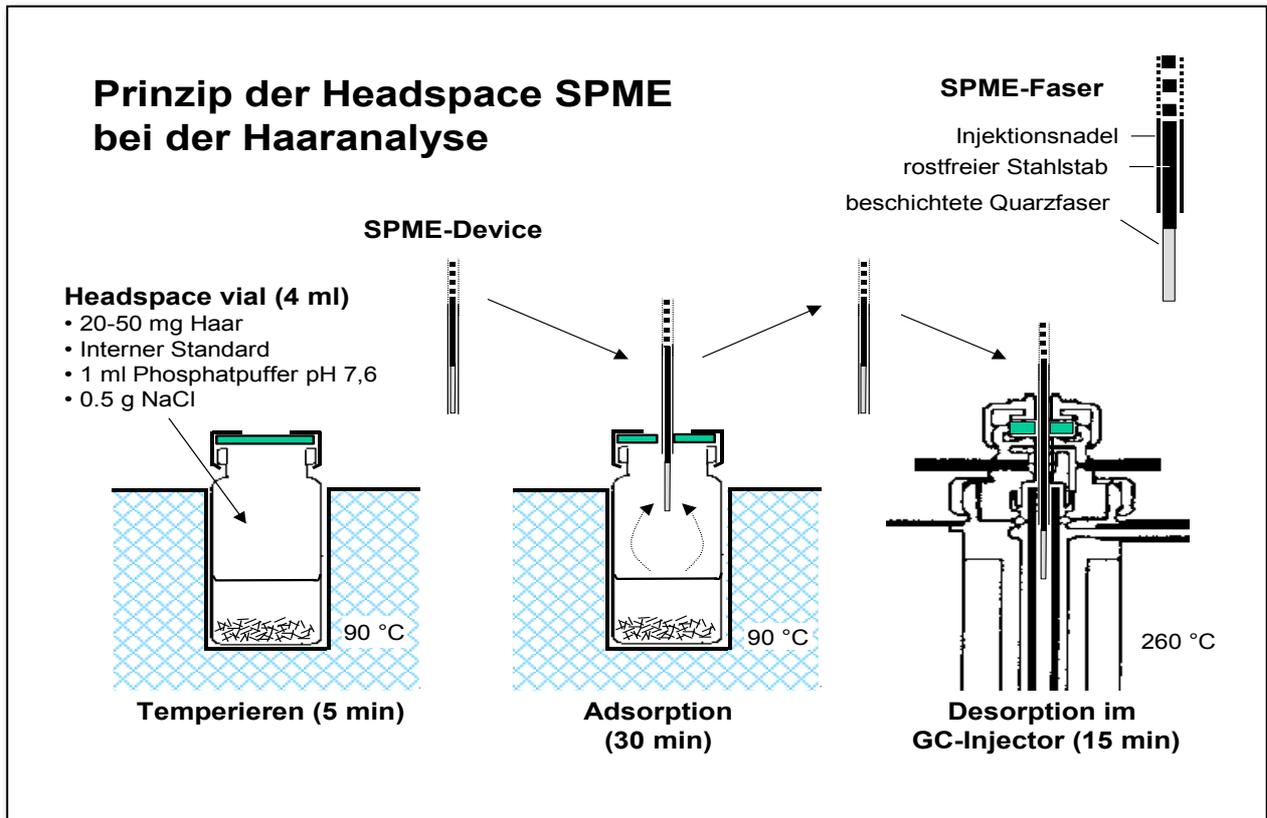


Abbildung 8: Prinzip der HS-SPME (14)

3.8.2.2 Gaschromatographie

Das vorherrschende Trennprinzip der gaschromatographischen Analyse organischer Verbindungen ist die Verteilung der gasförmigen Moleküle zwischen der flüssigen, stationären und der mobilen Phase. Neben dieser Wechselwirkung der Analyte ist ihre relative Flüchtigkeit für die Trennung maßgeblich. Die Durchführung der GC setzt eine unzersetzbare Verdampfbarkeit der zu analysierenden Substanzen in einem Temperaturbereich von 50-300 °C voraus. Diese so entstehenden flüchtigen Substanzen werden in einem Trägerstrom, bestehend aus einem Inertgas, wie im Falle der vorgelegten Arbeit Helium, durch die Säule geführt. Das Inertgas sollte eine hohe Reinheit und eine niedrige Viskosität aufweisen. Die Innenoberfläche der Säule ist beschichtet mit der stationären Phase (Polydimethylsiloxan). Die Filmdicke der stationären Phase liegt bei 0,25 µm, die Länge der Säule ist variabel und beträgt durchschnittlich 28 m, der Durchmesser liegt bei 0,25 mm.

Im Injektor, der bis auf 260 °C vorgeheizt wird, findet auf dem kühleren Säulenkopf die Kondensation der Substanzen statt. Durch eine Temperaturerhöhung verdampfen im Folgenden die Lösungsmittel und werden nach 3 Minuten über ein Splitventil abgelassen. Die weitere Temperaturerhöhung führt, abhängig von ihrem speziellen

Siedepunkt, zum Verdampfen der Analyten. Daraufhin treten die gasförmigen Analytenmoleküle zeitlich versetzt in die Trägerphase. Bei chemisch verwandten Verbindungen wie den hier bearbeiteten FSEE sind die unterschiedlichen Dampfdrücke entscheidend. Der hauptsächliche Trenneffekt wird durch die differente Verteilung der Moleküle zwischen der stationären, flüssigen und gasförmigen Phase bei unterschiedlich starker Adsorption an der stationären Phase erzeugt. Die einzelnen Substanzen erreichen folglich nach verschiedenen Strömungszeiten - sogenannten Retentionszeiten - den Detektor. Die Detektion erfolgt mit einem Massenspektrometer (MS) (96).

3.8.2.3 Massenspektrometrie

In der Spurenanalytik gilt die MS zur Suche nach bestimmten Zielsubstanzen (auch Substanzgemischen) und zur Strukturaufklärung als eine der wichtigsten Detektionsmethoden für die Gaschromatographie. Neben der qualitativen Analytik bietet sie zusätzlich den Vorteil, die Substanz sehr genau zu quantifizieren. Das spielt in der Toxikologie eine herausragende Rolle (45, 49, 63).

Der schematische Aufbau eines GC/MS beinhaltet das Einlasssystem, die Säule und die Ionenquelle. Daraufhin folgen der Massenanalysator, der Detektor und das Datenverarbeitungssystem (siehe Abbildung 9).

In dieser Arbeit wurden Gemische flüchtiger Stoffe untersucht, die im Vakuum unzersetzt verdampfbar sind, weshalb vorliegend die Elektronenstoß-Ionisation (EI) Anwendung gefunden hat.

Die zu analysierende Substanz wird im Hochvakuum von $< 10^{-4}$ Pa beim Erhitzen verdampft. Dieser Dampf trifft dann auf einen Strahl beschleunigter Elektronen mit einer Energie von 70 eV aus einem Filament, einer beheizten Kathode; die Elektronen kollidieren mit den intakten, gasförmigen Molekülen. Durch diesen Vorgang wird ein Elektron aus dem Molekül herausgeschlagen und es entsteht ein positiv geladenes Radikalkation. Die entstandenen ionisierten Teilchen werden im Massenanalysator nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt. Bei dem Massenanalysator handelt es sich um ein Quadrupolmassenspektrometer, in dem der erzeugte Ionenstrahl zwischen vier stabförmigen Polen (Magnetpaare mit positiver oder negativer Spannung) durch das elektrische Wechselfeld gelenkt wird. Die Spannungen und Frequenzen werden so verändert, dass nur ausgewählte Ionen auf der Flugbahn durch den Massenanalysator verbleiben und schließlich im Detektor registriert werden.

Als Detektor dient ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Dieser besitzt einen hohen Verstärkungsfaktor und ist daher für die Detektion auch geringer Ionenströme geeignet. Der erzeugte Entladungsstrom wird über mehrere Schritte in ein elektrisches Signal umgewandelt, d. h. in dem Massenspektrum wird die detektierte Ionenmenge gegen m/z aufgetragen.

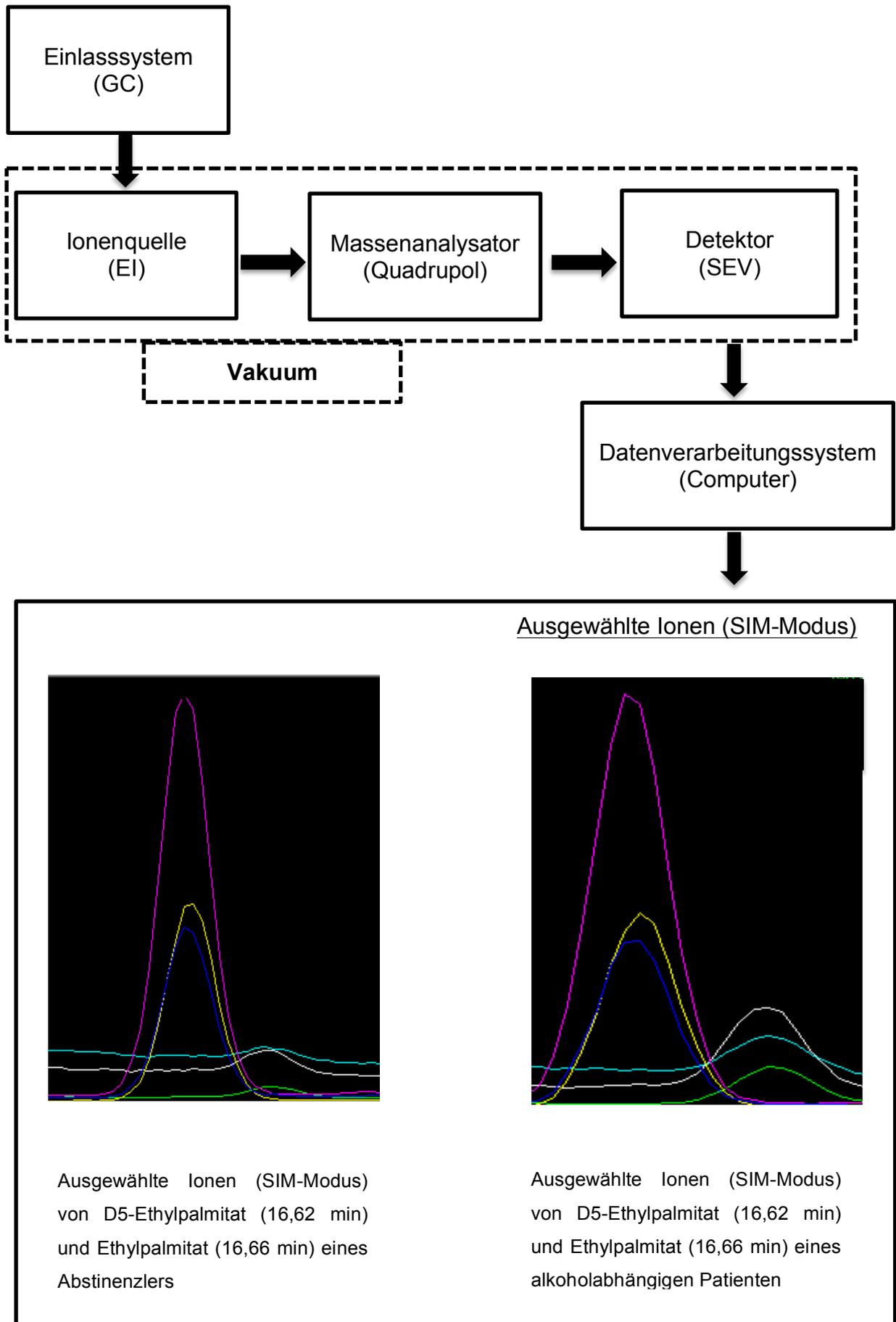


Abbildung 9: Prinzip der MS

3.8.2.4 GC/MS - Auswertung und Methodvalidierung

Die Methode wurde gemäß den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert; die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 ermittelt (99). Eine ausführliche Darstellung findet sich hierzu bei Hastedt M. (57). In Tabelle 7 sind die geschätzten Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen für die verwendete Methode zusammengefasst.

Tabelle 7: Geschätzte Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen anhand der DIN 32645 (57)

FSEE	LOD¹ (ng/mg)	LLOQ² (ng/mg)	μ³(bias) (%)	μ³(Rw⁴) (%)	U⁵ (coverage factor of 2) (%)
Ethylmyristat	0,009	0,013	15	4	32
Ethylpalmitat	0,009	0,019	9	8	24
Ethyloleat	0,014	0,031	8	4	18
Ethylstearat	0,004	0,011	11	6	25

1 Nachweisgrenze, 2 Bestimmungsgrenze, 3 Sollwert, 4 Reststandardabweichung, 5 erweiterte Messunsicherheit

3.8.3 Geräte

3.8.3.1 Geräte für die Probenvorbereitung

- Metallblockthermostat/Evaporator: Liebisch (Bielefeld), Typ 2366-DA mit Stickstoffzufuhr über Multiplex-Ventildepot zum Abblasen
- Vortexer: Janke & Kunkel GmbH & Co. KG (Staufen), VF2
- Schüttler: Eppendorf (Hamburg), Thermomixer 5432

3.8.3.2 HS-SPME und GC/MS

Die Messungen wurden durchgeführt mit einem GC/MSD-System der Firma Hewlett-Packard GmbH (HP) (Waldbronn) in der folgenden Konfiguration:

- Gaschromatograph HP 6890
- Massenselektiver Detektor HP 5973
- Multi Purpose Sampler MPS2 (Firma Gerstel, Mühlheim/Ruhr)
- Software: HP-Chemstation G1701BA, Version B.00.00

- Chromatographische Trennsäule HP 5-MSi: Länge 28 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Innenbeschichtung 0,25 μm , Trennphase aus PDMS mit 5 % Phenylanteil
- SPME-Faser beschichtet mit einem 65 μm dicken PDMS-DVB-Copolymer von Supelco (Deisenhofen)
- Als Trägergas für die Gaschromatographie diente Helium 5.0 der Firma AGA

3.8.4 Reagenzien

3.8.4.1 Deuterierte Fettsäureethylester

Es wurden zertifizierte D_5 -Myristinsäureethylester, D_5 -Palmitinsäureethylester, D_5 -Ölsäureethylester und D_5 -Stearinsäureethylester als innere Standardsubstanzen (Firma LGC Promochem, Wesel) verwendet. Bei diesen Standardsubstanzen ist die C_2H_5 -Gruppe durch die C_2D_5 -Gruppe ersetzt und damit die Molmasse um fünf Einheiten erhöht worden. Da die deuterierten Ester sich bei der Probenvorbereitung analog den undeuterierten Analyten verhalten, im Massenspektrometer jedoch getrennt von diesen detektiert werden, stellen sie ideale innere Standards in der GC/MS dar.

Es wurde eine Lösung dieser vier Ester in n-Heptan mit einer Konzentration von je 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durch Einwaage und Verdünnung hergestellt.

3.8.4.2 Phosphatpuffer pH 7,6 nach Sørensen

3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und 9,1 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) \times 2 H_2O wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Unter pH-Kontrolle, mittels pH-Meter, wurde durch Zugabe von 10 ml NAOH-Lösung (1 mol/l) ein pH von 7,6 eingestellt.

3.8.4.3 Sonstige verwendete Chemikalien und Standardsubstanzen

Firma E. Merck: DMSO (> 99,7 %), n-Heptan (> 99 %), NaCl (> 99,5 %), KH_2PO_4 (99 %), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Puffersubstanz)

Firma Aldrich: Ethylmyristat (99 %), Ethylpalmitat (99 %), Ethyloleat (98 %), Ethylstearat (99 %)

3.9 Nachweis von Ethylglucuronid im Haar

Die Bestimmung von EtG im Haar wurde mittels LC-ESI-MS-MS nach validierten Methoden durchgeführt (106). Die Bestimmungsgrenze LLOQ und Nachweisgrenze LOD für EtG lagen bei 7 pg/mg und 2 pg/mg.

3.9.1 Probenvorbereitung

Nach der durchgeführten Probenentnahme und der Verpackung in Alufolie und einen luftdicht verschlossenen Umschlag wurde dieser beschriftet und an das Labor von Dr. M. Rothe (Lipidomix GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin) versendet. Dort wurde die Analyse der Haarproben auf EtG durchgeführt und die Ergebnisse wurden zeitnah übermittelt.

3.9.2 Bestimmung von Ethylglucuronid

Ethylglucuronid wurde mittels LC-ESI-MS-MS bestimmt. Gleichartige Methoden wurden bereits von verschiedenen anderen Autoren beschrieben (5, 19, 67, 91).

Für die Analyse wurde ebenfalls der kopfhautnahe 3-cm-Abschnitt der Haarprobe verwendet. Waren die Haare kürzer, wurde die komplette Länge eingewogen. Insgesamt wurden zwischen 30 und 50 mg Haare für die Untersuchung verwendet und in ca. 2-3 mm lange Stücke zerschnitten.

Zur Reinigung wurden die Haare im 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für 5 Minuten mit 1 ml Dichlormethan und für weniger als 1 Minute mit 1 ml Methanol versetzt. Weiterhin wurde die Probe mit 1 ml Wasser und 27,5 ng EtG-D₅ in 50 µl Acetonitril/Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 Minuten mit Ultraschall behandelt. Daraufhin wurde das Gemisch über 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch die manuelle Festphasenextraktion mittels Oasis MAX Patrone (3 ml, 60 mg, Waters GmbH, Eschborn) folgendermaßen gereinigt:

- Aufbereitung mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser
- Hinzufügen der wässrigen Probe
- Reinigung mit 1 ml 5%igem NH₃ in Wasser und 1 ml 1%igem NH₃ in Methanol
- Behutsames Trocknen unter einem Luftstrom
- Auswaschung mit 1,8 ml 1%iger Ameisensäure in Methanol
- Eindampfen bei 60 °C in einem Stickstoffstrom
- Auflösen des Reststoffes in 100 µl mobiler Phase

Die Messung erfolgte mittels LC-MS-MS Agilent 1200SL/Agilent 6410 (Agilent Technologies, Waldbronn). Dieses Gerät war ausgestattet mit einer Thermo Hypercarb-Säule (100 mm x 2,1 mm x 5 µm, ThermoFisher Scientific, Dreieich). Die Chromatographie wurde unter isokratischen Bedingungen durchgeführt: Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (8:92, v/v) als mobile Phase, Flussrate 0,3 ml/min, Laufzeit 5 min. Das injizierte Volumen betrug 50 µl und die Retentionszeit des EtG lag bei 3,3 min.

Für die MS-MS wurden folgende Einstellungen verwendet: Elektrospray-Ionisation (ESI) in negativem Modus, Spray-Spannung 4 kV, Stickstofftemperatur 330 °C, Stickstofffluss 10 l/min, Verneblerdruck 40 psi.

Beim Multiple Reaction Monitoring (MRM) wurden zur Quantifizierung folgende Übergänge benutzt (Kegelspannung 100 V; Kollisionsenergie 12 eV; Verweilzeit 300 ms): EtG: 221,2 > 75,1 und 221,2 > 85,1; EtG-D₅: 226,2 > 75,1 und 226,2 > 85,1.

Zur Kalibrierung wurden Haare von Kindern mit bestimmten EtG-Konzentrationen (4-8000 pg/mg) versetzt und gemessen. Die Kalibrierungskurve der Peak-Fläche des Verhältnisses von EtG/EtG-D₅ vs. der Konzentration von EtG war linear über die komplette Konzentrationsbreite ($R^2 = 0,998$). Weiterhin konnte sie jedes Mal, nach der Herstellung eines neuen internen Standards, sehr gut reproduziert werden (106).

4 Ergebnisse

4.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Alkoholkonsummarker innerhalb der Konsumgruppen

Tabelle 8: Gerundete arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen für die Alkoholkonsummarker, unterteilt nach der Trinkmenge

Biomarker	Gesamt	Abstinenzler/ Normaltrinker	Patienten mit chronischem Alkoholabusus
EtG (pg/mg)	77 (\pm 245 %)	3,8 (\pm 245 %)	184 (\pm 143 %)
FSEE sum (ng/mg)	0,87 (\pm 214 %)	0,40 (\pm 116 %)	1,54 (\pm 176 %)
CDT (%)	2,6 (\pm 80 %)	1,8 (\pm 25 %)	3,7 (\pm 77 %)
GGT (U/L)	107 (\pm 232 %)	22 (\pm 116 %)	230 (\pm 155 %)
MCV (fl)	92 (\pm 7 %)	89 (\pm 5 %)	95 (\pm 6 %)
AST (U/L)	48 (\pm 96 %)	31 (\pm 67 %)	72 (\pm 84 %)
ALT (U/L)	43 (\pm 113 %)	27 (\pm 95 %)	65 (\pm 95 %)

In Tabelle 8 werden für jeden Biomarker, der in dieser Arbeit untersucht worden ist, der Mittelwert und die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) in der jeweiligen Konsumkategorie dargestellt.

Alle Mittelwerte der Gruppe der Abstinenzler und Normaltrinker lagen innerhalb der Referenzbereiche bzw. unterhalb der Cut-off-Grenzen. Bei den Mittelwerten der Patienten mit chronischem Alkoholabusus waren alle Werte, bis auf den MCV-Mittelwert, außerhalb des Normbereichs im pathologischen Bereich.

Aus der vorliegenden Tabelle ist ersichtlich, dass die mittleren Messwerte des EtG in der Gruppe der Patienten, die weniger als 60 g Ethanol pro Tag konsumierten, den größten Unterschied zu den Mittelwerten des EtG in der Gruppe der 60 g Ethanol oder mehr pro Tag konsumierenden Probanden aufwiesen. Dies zeichnet EtG als den Marker mit dem besten Diskriminierungsvermögen aus. Am kleinsten war beim Vergleich der beiden Gruppen der Unterschied der Mittelwerte von MCV. Hier war die Streuung innerhalb der jeweiligen Gruppe sehr gering (5 %; 6 %), dennoch war die Überlappung der beiden unterschiedlichen Gruppen ebenfalls gering.

Der T-Test bestätigte, dass alle ermittelten Werte auf die Grundgesamtheit anwendbar sind, da ihr Signifikanzwert jeweils unter 0,05 liegt.

Somit liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit bei 0,0 %, dass bei erneuter Testung einer Grundgesamtheit beispielsweise die Enzymaktivität der AST unter den Patienten mit chronischem Alkoholabusus höher sein wird als die Enzymaktivität der AST bei den Normaltrinkern. Gleiches gilt für ALT, GGT, MCV, CDT und EtG. Für FSEE sum liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit im T-Test bei 0,5 % und ist damit ebenfalls verschwindend gering. Somit kann auch hier davon ausgegangen werden, dass bei erneuter Testung die Werte bei den Patienten mit chronischem Alkoholabusus ebenfalls höher sind als bei den Normaltrinkern.

Tabelle 9: Referenzbereiche der einzelnen Biomarker

Biomarker	Referenzbereich
EtG¹	< 30 pg/mg
FSEE sum¹	< 0,5 ng/mg
CDT²	< 2,5 %
GGT²	m ³ : < 55 U/L w ⁴ : < 38 U/L
MCV²	81–100 fl
AST²	m ³ : < 50 U/L w ⁴ : < 35 U/L
ALT²	m ³ : < 45 U/L w ⁴ : < 34 U/L

1 Gemessen im Haar, 2 Gemessen
im Blut, 3 männlich, 4 weiblich

4.2 Falsch positive und falsch negative Ergebnisse für die analysierten Alkoholkonsummarker

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Grenzwerte für pathologischen Konsum von Alkohol stehen in Übereinstimmung¹ mit den Grenzwerten, die alle zwei Jahre von der SoHT vorgeschlagen werden (EtG und FSEE), bzw. entsprechen den Grenzwerten des jeweiligen Labors, in welchem die Blutanalyse durchgeführt wurde (AST, ALT, GGT, MCV und CDT) (37).

Um zu beurteilen, ob sich der jeweilige Haar- bzw. Blutmarker gut oder schlecht für den Nachweis von Abstinenz bzw. chronischem Alkoholkonsum eignet, wurden jeweils Kontingenztafeln mit zwei nominalen Variablen erstellt.

Tabelle 10: Falsch positive und falsch negative Ergebnisse der einzelnen Biomarker unter Anwendung der verschiedenen Grenzwerte (insgesamt 132 Probanden)

Biomarker	Referenzbereich	Positiv Gesamt	Falsch positiv	Negativ Gesamt	Falsch negativ
EtG¹	< 30 pg/mg	46	2	86	10
FSEE sum¹	< 0,5 ng/mg	55	16	77	15
CDT²	< 2,5 %	32	4	100	26
GGT²	m ³ : < 55 U/L	47	6	85	13
	w ⁴ : < 38 U/L				
MCV²	81–100 fl	22	4	110	36
AST²	m ³ : < 50 U/L	35	6	97	25
	w ⁴ : < 35 U/L				
ALT²	m ³ : < 45 U/L	38	10	94	26
	w ⁴ : < 34 U/L				

1 Gemessen im Haar, 2 Gemessen im Blut, 3 männlich, 4 weiblich

Tabelle 10 differenziert zwischen Abstinenzlern bzw. Normaltrinkern und Patienten mit chronischem Alkoholkonsum und stellt sowohl die falsch positiven Werte für die einzelnen Biomarker als auch die falsch negativen Werte dar. Als Abstinenzler und Normaltrinker galten alle Probanden, die weniger als 60 g Ethanol pro Tag in den letzten 14 Tagen vor der Probenentnahme zu sich genommen hatten. Als Probanden mit chronischem Alkoholkonsum galten alle Probanden, die in den letzten 14 Tagen oder längerfristig vor der Probenentnahme 60 g Ethanol und mehr pro Tag zu sich genommen hatten.

Tabelle 11: Einteilung des Alkoholkonsums der Abstinenzler (n = 9) und Normaltrinker (n = 69): richtige und falsche Fallzuordnungen der Biomarker

Biomarker	0 g Ethanol pro Tag		> 0 g - < 60 g Ethanol pro Tag	
	Richtig negativ	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch positiv
EtG ¹	9	0	67	2
FSEE sum ¹	5	4	57	12
CDT ²	9	0	65	4
GGT ²	9	0	63	6
MCV ²	9	0	65	4
AST ²	9	0	63	6
ALT ²	8	1	60	9

1 Gemessen im Haar, 2 Gemessen im Blut

Tabelle 12: Einteilung des Alkoholkonsums der Alkoholentzugspatienten (n = 54): richtige und falsche Fallzuordnungen der Biomarker

Biomarker	≥ 60 g – 120 g Ethanol pro Tag		> 120 g Ethanol pro Tag	
	Richtig positiv	Falsch negativ	Richtig positiv	Falsch negativ
EtG ¹	20	5	24	5
FSEE sum ¹	16	9	23	6
CDT ²	13	12	15	14
GGT ²	17	8	24	5
MCV ²	6	19	12	17
AST ²	10	15	19	10
ALT ²	10	15	18	11

1 Gemessen im Haar, 2 Gemessen im Blut

Die Tabellen 11 und 12 stellen ebenfalls die bei der Anwendung der vorgeschlagenen Grenzwerte erhaltenen richtigen und falschen Fallzuordnungen dar. In Tabelle 11 wurde zwischen Abstinenzlern und Normaltrinkern unterschieden. Tabelle 12 unterteilt die Probanden mit chronischem Alkoholkonsum in Patienten mit einem Alkoholkonsum

von 60 bis 120 g Ethanol pro Tag und Patienten, die pro Tag mehr als 120 g Ethanol zu sich nahmen.

Tendenziell werden in der Gruppe der Abstinenzler und Normaltrinker umso weniger Probanden als falsch positiv erkannt, desto geringer ihr Alkoholkonsum ist. Umgekehrt ist es in der Gruppe der Alkoholentzugspatienten, unter denen umso weniger Probanden als falsch negativ erkannt werden, je höher ihr Alkoholkonsum ist.

In der Gruppe der Abstinenzler bzw. Normaltrinker befanden sich insgesamt 78 Probanden. Hiervon wurden anhand der EtG-Werte 76 Probanden als richtig negativ erkannt. Die Summe der FSEE diskriminierte in weniger Fällen (62-mal) die Probanden als richtig negativ. Auch wurde bei den FSEE am häufigsten (16-mal) ein Proband, der weniger als 60 g Ethanol pro Tag trank (12-mal) oder gar keinen Alkohol konsumierte (4-mal), als falsch positiv eingestuft. Dagegen wurden anhand der EtG-Werte nur zwei Probanden als falsch positiv eingestuft. Von den 9 Abstinenzlern hatten alle einen EtG-Wert von 0 bzw. unter der Nachweisgrenze der Methode (LOD 2 pg/mg Haar).

54 Probanden stammten aus der Gruppe mit chronischem Alkoholabusus. Hiervon wurden anhand des EtG-Wertes 44 Probanden als richtig positiv getestet. Mittels des MCV wurden die wenigsten der Probanden (18) als richtig positiv getestet. Auch wurde bei dem MCV-Wert am häufigsten (36-mal) ein Proband, der generell mehr als 60 g Ethanol pro Tag trank (19-mal) oder mehr als 120 g Ethanol pro Tag konsumierte (17-mal), als falsch negativ eingestuft. Minimal wurden anhand des EtG-Wertes 10 Probanden als falsch negativ eingestuft. Von diesen 10 Probanden konsumierten 5 Probanden mehr als 60 g, jedoch weniger als 120 g Ethanol pro Tag; 5 der anhand des EtG-Wertes falsch negativ bewerteten Probanden wiesen einen Konsum von mehr als 120 g Ethanol pro Tag auf.

Unter den 9 Abstinenzlern wurden 4, mittels der Summe der FSEE, als falsch positiv eingestuft. Innerhalb der Gruppe der Normaltrinker wurden 12 als falsch positiv mittels der Summe der FSEE bewertet.

Bei den Patienten der Konsumgruppe „gefährliches Trinken“ wurden maximal 19 falsch negativ, anhand des Wertes des MCV, eingestuft. Unter allen Patienten, die exzessiven Alkoholkonsum betrieben, wurden maximal 17 Patienten mittels des Wertes des MCV als falsch negativ beurteilt.

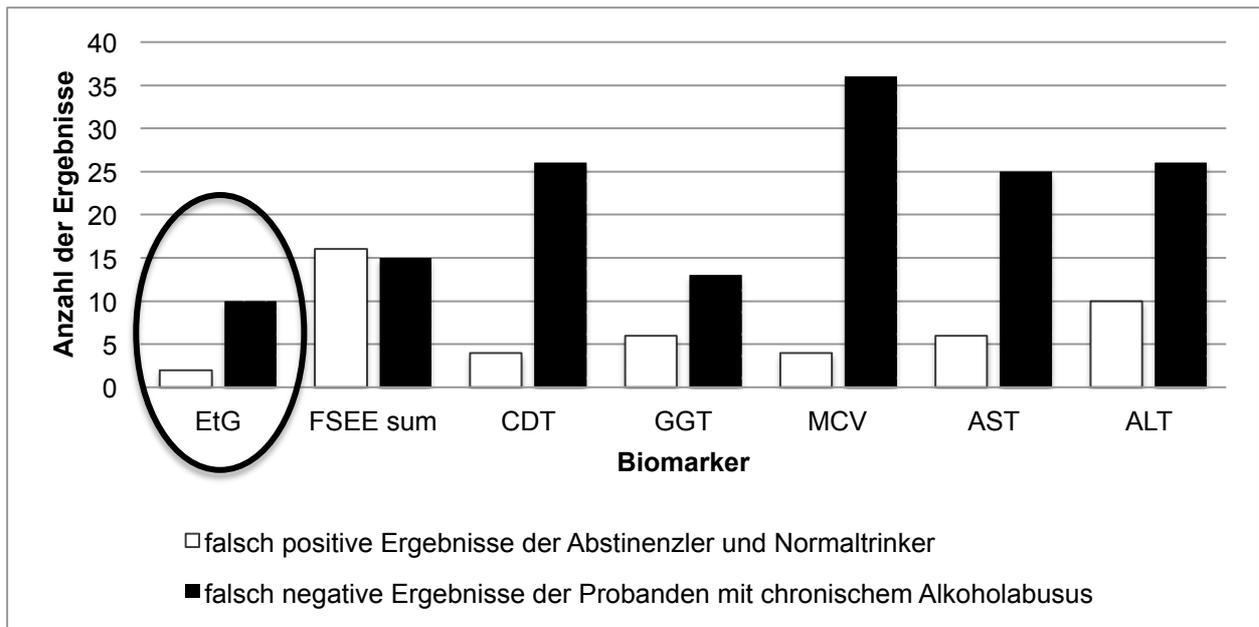


Abbildung 10: Darstellung der falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse der Biomarker anhand der in der Einleitung beschriebenen Cut-off-Grenzen und Referenzbereiche

4.3 ROC-Kurven-Analyse

Die ROC-Kurven (Grenzwertoptimierungskurven) (siehe Abbildung 11, zur besseren Übersicht wurde in der Grafik der Nullpunkt der Ordinate verschoben) ergaben sich durch Variation von Sensitivität und Spezifität eines jeden in dieser Arbeit verwendeten Biomarkers. Die errechneten Wertepaare für Sensitivität und Spezifität eines jeden diagnostischen Tests (aller Biomarker) für alle möglichen Cut-off-Werte bzw. Normwerte innerhalb des Messbereichs wurden entlang von Abszisse und Ordinate aufgetragen. Die Flächen unter den Kurven (AUC) können zur Beurteilung der Güte der Tests herangezogen werden. Der Tabelle 13 können diese Daten zusammen mit den AUC und den Cut-off-Werten bzw. Normwerten entnommen werden.

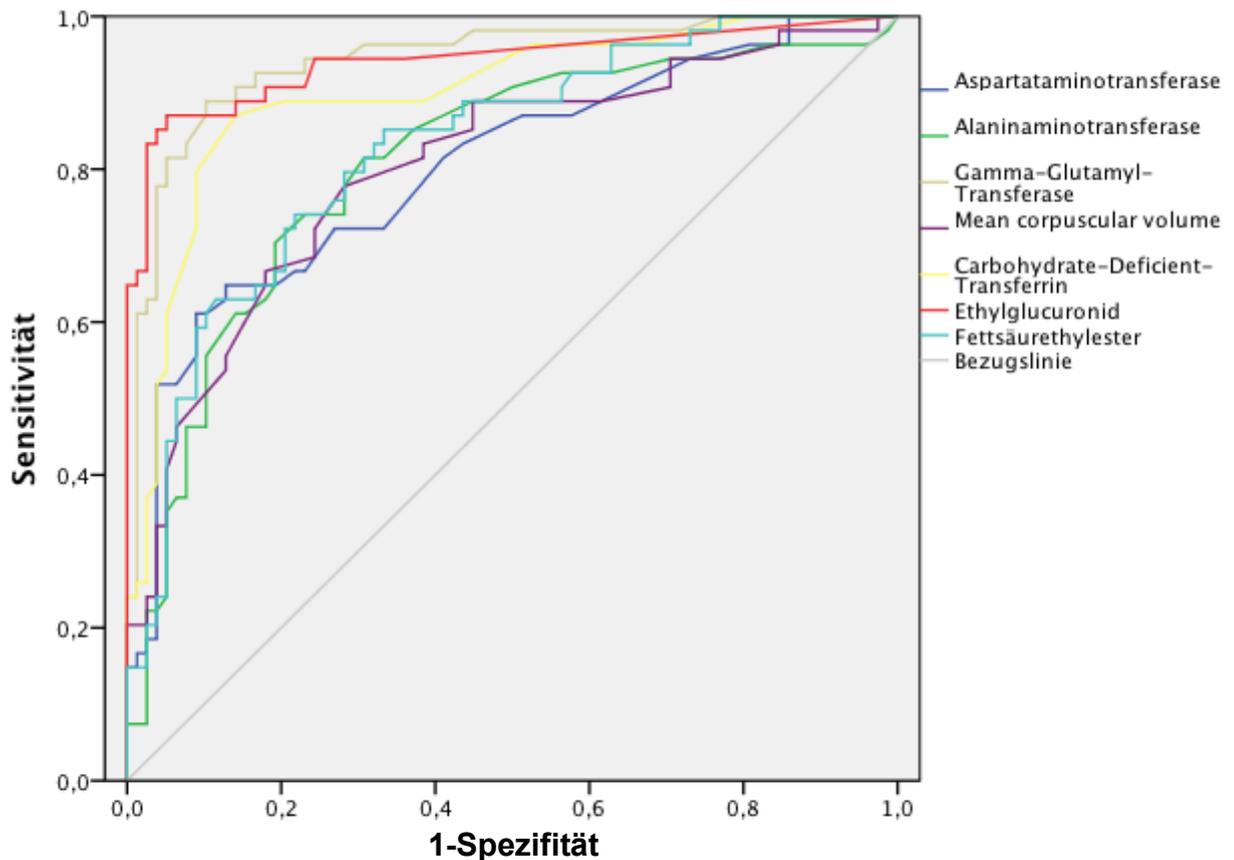


Abbildung 11: ROC-Kurven der 7 Biomarker

Tabelle 13: Flächen unter den ROC-Kurven berechnet anhand der in der Literatur vorgegebenen Obergrenzen der Normbereiche und Cut-off-Werte (der Wert für EtG entspricht dabei dem in der ROC-Kurven-Analyse ermittelten optimierten Grenzwert)

	Fläche unter der ROC-Kurve	Cut-off-Wert/ Normwert	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
EtG	0,941	28 pg/mg	83,3	97,4
FSEE sum	0,828	0,5 ng/mg	72,2	79,5
CDT	0,899	2,5 %	59,3	94,9
GGT	0,943	55 U/L ¹	74,1	96,2
		38 U/L ²	87,0	89,7
MCV	0,803	100 fl	18,5	100
ALT	0,808	45 U/L ¹	51,9	89,7
		34 U/L ²	64,8	80,8
AST	0,802	50 U/L ¹	50,0	96,2
		35 U/L ²	64,8	80,8

1 männlich, 2 weiblich

Aus Tabelle 13 geht hervor, dass EtG, GGT und FSEE sum im Rahmen dieser durchgeführten Studie die Marker mit der höchsten Sensitivität sind. Für EtG liegen die Sensitivität und die Spezifität bei einem Cut-off-Wert von 28 pg/mg bei 83,3 % und 97,4 %. Angewendet bedeutet dies, dass ein Proband mit chronischem Alkoholabusus mit einer Wahrscheinlichkeit von 83,3 % bei einer Testung durch diesen Marker als solcher richtig positiv identifiziert wird. Umgekehrt wird ein Normaltrinker in 2,6 % der Fälle fälschlicherweise in die Gruppe der übermäßigen Alkoholkonsumenten eingestuft. Die AUC für EtG beträgt 0,941. Dies bedeutet, dass in einem binären Klassifikationsschema ein zufällig ausgewählter positiver Fall eine 94,1%ige Chance hat, einen höheren Messwert zu haben als ein zufällig ausgewählter negativer Fall. GGT lieferte in dieser Arbeit eine ebenso gute Performance ab. Seine AUC liegt bei 0,943 und die Sensitivität bei 80,5 % gepaart mit einer Spezifität von 92,95 % (Mittelwerte aus den beiden Werten für Frauen und Männer). CDT kann bei der Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve mit 0,899 gut mithalten, büßt jedoch bei der Sensitivität mit nur 59,3 % stark ein. Dies steht der relativ hohen Spezifität dieses Markers mit 94,9 % entgegen. Eher hinten an schließen sich die Marker ALT und AST sowie MCV (Flächen unter den Kurven: 0,808, 0,802 und 0,803). MCV sticht durch

seine absolute Spezifität von 100 % hervor, zeigt jedoch im Gegenzug dazu die schwächste Sensitivität von nur 18,5 %. Die Summe der FSEE erkennt immerhin 72,2 % der Patienten mit chronischem Alkoholabusus als richtig positiv, jedoch klassifiziert dieser Marker auch 20,5 % der Normaltrinker als falsch positiv.

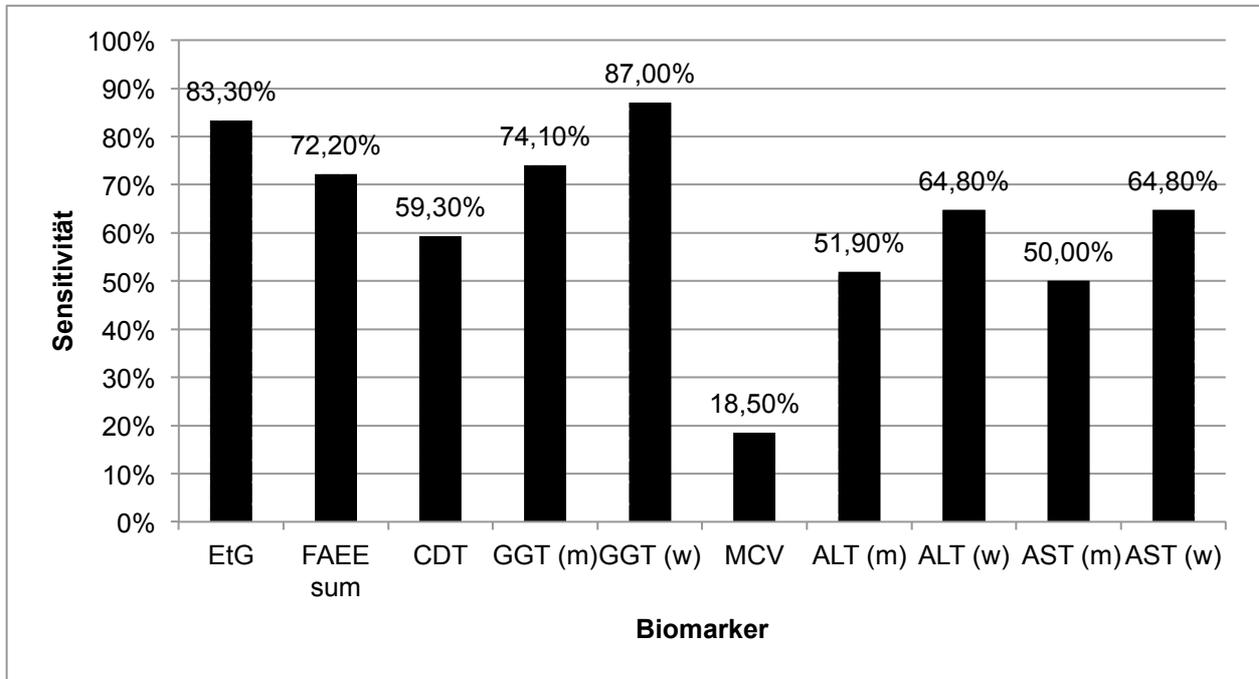


Abbildung 12: Sensitivität der einzelnen Biomarker in den Haaren und im Blut

4.4 Kombinierte Interpretation der Haarmarker Ethylglucuronid und Fettsäureethylester

Anhand eines von Hastedt et al. 2012 (58) entworfenen Schemas wurden die Ergebnisse der Analysen von EtG und FSEE kombiniert interpretiert. Die Kriterien dieses Schemas basieren auf früheren Studien bzw. den aktuellen Richtlinien (75, 106, 116).

Tabelle 14: Kombinierte Interpretation der FSEE- und der EtG-Konzentrationen in den kopfhautnahen 3-cm-Abschnitten der Haarproben zur Feststellung von Alkoholmissbrauch entsprechend Pragst et al. (2010) (106), unter Anwendung der aktuellen Cut-off-Werte von 0,5 ng/mg für FSEE und 30 pg/mg für EtG laut SoHT (58, 75)

Gruppe	C _{FSEE} (ng/mg)	C _{EtG} (pg/mg)	Interpretation	Normal-trinker (78 Personen)	Patienten mit chronischem Alkoholabusus (54 Personen)
1	≤ 0,20	< 7	Abstinenz oder mäßiges Trinken	21	0
2	≤ 0,20	≥ 7 < 30	Mäßiges Trinken, Abstinenz ausgeschlossen	3	0
			Wiederholen der Analysen beider Parameter.		
3	≤ 0,20	30-60	Bei Bestätigung: soziales Trinkverhalten, schwacher Hinweis auf Missbrauch	1	0
			Wiederholen der Analysen beider Parameter.		
			Bei Bestätigung: Suche nach beeinflussender Haarkosmetik.		
4	≤ 0,20	> 60	Ergebnislos: Neue Haarprobengewinnung und/oder Körperhaaruntersuchung (kein Schamhaar)	0	2
5	0,21 – 0,49	< 7	Mäßiges Trinken, Abstinenz unwahrscheinlich	33	3
6	0,21 – 0,49	≥ 7 < 30	Mäßiges Trinken, Abstinenz ausgeschlossen	4	2

7	0,21 – 0,49	30-60	Soziales Trinkverhalten, schwacher Hinweis auf Missbrauch	0	3
8	0,21 – 0,49	> 60	Anzeichen für Alkoholmissbrauch	0	5
9	0,50 – 0,99	< 7	Wiederholen der Analysen beider Parameter. Bei Bestätigung: Suche nach beeinflussender Haarkosmetik, soziales Trinkverhalten, schwacher Hinweis auf Missbrauch	10	2
10	0,50 – 0,99	≥ 7 < 30	Soziales Trinkverhalten, schwacher Hinweis auf Missbrauch	1	0
11	0,50 – 0,99	30-60	Starker Hinweis auf Alkoholmissbrauch	1	4
12	0,50 – 0,99	> 60	Starker Hinweis auf Alkoholmissbrauch	0	9
13	≥ 1,00	< 7	Wiederholen der Analysen beider Parameter. Bei Bestätigung: Suche nach EtOH in Haarspray oder anderen Haarpflegeprodukten (falsch positives FSEE), Bleichung, Färbung, extremes Haarewaschen mit Shampoo (falsch negatives EtG). Ergebnislos: Neue Haarprobengewinnung und/oder	3	2

			Körperhaaruntersuchung (kein Schamhaar)		
14	$\geq 1,00$	≥ 7 < 30	Hinweis auf Alkoholmissbrauch	1	1
15	$\geq 1,00$	30-60	Starker Hinweis auf Alkoholmissbrauch	0	4
16	$\geq 1,00$	> 60	Starker Hinweis auf Alkoholmissbrauch	0	17

Betrachtet man die obenstehende Einteilung genauer, so sieht man, dass von den 78 Probanden, die angegeben haben, dass sie weniger als 60 g Ethanol pro Tag trinken, 62 Personen auch als Abstinenzler bzw. mäßige Trinker charakterisiert werden. Das macht 79,5 % aus, die als richtig negativ aus dieser kombinierten Betrachtung hervorgehen. 14 Probanden (20,5 %) sollten sich aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse einer weiteren Analyse unterziehen. 2 Probanden zeigen einen starken Hinweis auf Alkoholmissbrauch.

Innerhalb der Gruppe der 54 Patienten mit chronischem Alkoholmissbrauch wiesen 43 Personen (79,6 %) einen Hinweis auf Alkoholmissbrauch auf. In 6 Fällen sollte die Analyse wiederholt werden. Insgesamt 5 Probanden (9,3 %) wurden anhand des Schemas als mäßige Trinker charakterisiert.

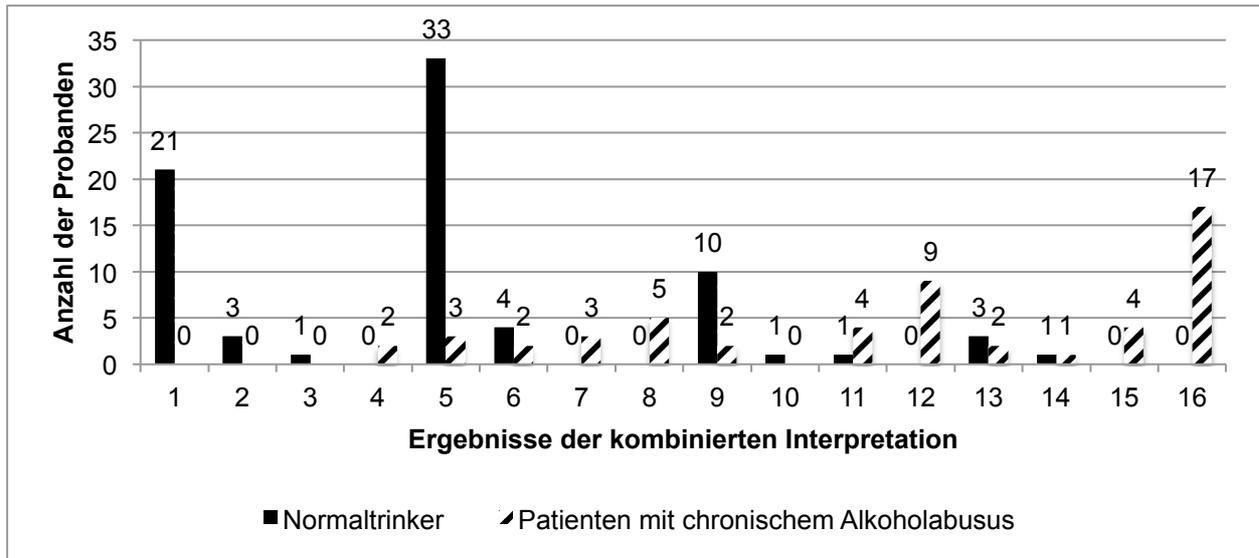


Abbildung 13: Darstellung der Personen (Normaltrinker und Alkoholentzugspatienten) zu den 16 verschiedenen Gruppen des obigen Schemas

Tabelle 15: Genaue Betrachtung der Normaltrinker mit falsch positiven EtG- und FSEE-Ergebnissen

Gruppe	Proband	AST	ALT	GGT	MCV	CDT	Alkohol- konsum pro Tag (g)	Ort der Haar- entnahme	Geschlecht
11	MB 47	-	-	-	-	+	35,6	Kopf	m
14	MB 78	-	-	-	-	-	47,9	Kopf	m

- Ergebnis nicht pathologisch

+ Ergebnis pathologisch

Tabelle 16: Genaue Betrachtung der 5 Probanden mit chronischem Alkoholabusus mit falsch negativen EtG- und FSEE-Ergebnissen

Gruppe	Proband	AST	ALT	GGT	MCV	CDT	Alkohol- konsum pro Tag (g)	Ort der Haar- entnahme	Geschlecht
5	MBK 23	+	+	+	-	+	90	Achsel	m
5	MBK 66	+	+	+	-	-	120	Kopf	m
5	MBK 72	-	-	+	-	-	182	Kopf	m
6	MBK 11	-	+	-	-	-	66	Kopf	m
6	MBK 62	+	+	+	-	-	210	Bein	m

- Ergebnis nicht pathologisch

+ Ergebnis pathologisch

4.5 Optimierte Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche für verbesserte Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker

Die ROC-Kurven-Analyse wurde ebenfalls durchgeführt, um optimale Cut-off-Werte für die einzelnen Haarmarker und optimale Obergrenzen der Normbereiche der Blutmarker zu ermitteln. Aufgrund der möglichen Folgen, die eine falsch positive Klassifizierung einer Testperson hätte, wurden die Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche so verändert, dass eine Mindestspezifität von 90 % erreicht wurde.

Der Cut-off-Wert für EtG (28 pg/mg) und die Obergrenze des Normbereichs für MCV (100 fl) blieben unverändert, da sich anhand dieser Werte schon die höchste Spezifität erreichen ließ. Mittels EtG wurden maximal 2,6 % (Spezifität: 97,4 %) und mittels MCV maximal 0 % (Spezifität 100 %) der Normaltrinker als falsch positiv beurteilt. Jedoch konnte die hohe Anzahl der mittels MCV als falsch negativ klassifizierten Probanden (81,5 %) nicht verbessert werden. Mittels EtG hingegen wurden weiterhin nur 16,7 % der Probanden mit chronisch erhöhtem Alkoholkonsum nicht erkannt.

Die Obergrenze des Normbereichs von CDT erreichte mit der Herabsetzung auf 2,4 % zwar keine Verbesserung der Spezifität (94,9 %), jedoch stieg die Zahl der richtig positiv erkannten Probanden von 59,3 % auf 61,1 %.

Bei GGT und AST konnte durch eine Annäherung der Obergrenzen der Normbereiche von Männern und Frauen jeweils eine leicht erhöhte Sensitivität erreicht werden. Bei den Markern FSEE sum und ALT führte eine Erhöhung des Cut-off-Werts bzw. der

Obergrenze des Normbereichs zu einer verbesserten Performance dieser Marker. Für FSEE sum (neuer Cut-off-Wert: 0,675 ng/mg) stieg die Spezifität von 79,5 % auf 91,0 %. Bei ALT konnte durch die Erhöhung des Wertes auf 53 U/L eine verbesserte Spezifität von ebenfalls 91,0 % erreicht werden.

Zusammengefasst blieben der Cut-off-Wert von EtG und die Obergrenze des Normbereichs von MCV gleich. Eine Erhöhung des Cut-off-Werts von FSEE sum sowie der Obergrenzen der Normbereiche von GGT, AST und ALT führte zu einer Verbesserung der Spezifität. Weniger Normaltrinker wurden demnach als falsch positiv klassifiziert.

Tabelle 17: Darstellung der optimierten Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker im Blut durch Veränderung der Cut-off-Werte bzw. der Obergrenzen der Normbereiche

	Cut-off-Wert/ Ober- grenze der Norm- bereiche (alt)	Cut-off-Wert/ Ober- grenze der Norm- bereiche (neu)	Sensitivität (alt) in %	Sensitivität (neu) in %	Spezifität (alt) in %	Spezifität (neu) in %
EtG¹	28 pg/mg	28 pg/mg	83,3	83,3	97,4	97,4
FSEE¹	0,5 ng/mg	0,675 ng/mg	72,2	59,3	79,5	91,0
CDT²	2,5 %	2,4 %	59,3	61,1	94,9	94,9
GGT²	55 U/L ³	51 U/L	74,1	77,8	96,2	96,2
	38 U/L ⁴	40 U/L	87,0	85,2	89,7	91,0
MCV²	100 fl	100 fl	18,5	18,5	100	100
ALT²	45 U/L ³	53 U/L	51,9	46,3	89,7	91,0
	34 U/L ⁴	53 U/L	64,8	46,3	80,8	91,0
AST²	50 U/L ³	49 U/L	50,0	51,9	96,2	96,2
	35 U/L ⁴	43 U/L	64,8	61,1	80,8	91,0

1 Gemessen im Haar, 2 Gemessen im Blut, 3 männlich, 4 weiblich

4.6 Systematische Fehler durch verschiedene Einflussgrößen in Korrelation mit den untersuchten Markern

Um zu untersuchen, ob Größen wie das Geschlecht, das Alter, das Körpergewicht, die Körpergröße, die Haarfarbe oder die Neigung zum Schwitzen zu systematischen Fehlern führen können, wurden jeweils Pearson-Korrelationen zwischen diesen Größen und den Biomarkern in Blut und Haaren berechnet. In keinem Fall konnte ein deutlicher Zusammenhang festgestellt werden. Fast alle Korrelationskoeffizienten waren vom Betrag her kleiner als 0,5.

Tabelle 18: Pearson-Korrelationen zwischen den Markern und den Einflussgrößen

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Körper- gewicht (kg)	Größe (cm)	Haar- farbe	Neigung zum Schwitzen
EtG	-0,277 ²	0,264 ²	-0,369 ²	-0,395 ²	0,373 ²	0,193 ¹
FSEE sum	-0,176 ¹	0,135	-0,210 ¹	-0,356 ²	0,220 ¹	0,225 ²
CDT	-0,297 ²	0,293 ²	-0,55	-0,084	0,332 ²	0,185 ¹
GGT	-0,222 ¹	0,271 ²	-0,070	-0,240 ²	0,351 ²	0,252 ²
MCV	-0,217 ¹	0,383 ²	0,010	-0,011	0,182 ¹	0,124
AST	-0,299 ²	0,287 ²	0,018	-0,118	0,346 ²	0,318 ²
ALT	-0,310 ²	0,240 ²	0,135	-0,050	0,293 ²	0,342 ²

1 Die Korrelation ist auf dem Niveau 0,05 (2-seitig) signifikant

2 Die Korrelation ist auf dem Niveau 0,01 (2-seitig) signifikant

4.7 Korrelation zwischen den untersuchten Biomarkern

Die Pearson-Korrelationen zwischen den untersuchten Biomarkern wurden ebenfalls wie in Tabelle 19 dargestellt berechnet. Alle Korrelationen waren auf einem Niveau von kleiner 0,05 signifikant. Die beste Korrelation haben die Enzymaktivitäten von AST und ALT zueinander gezeigt. Alle übrigen Korrelationen sind schlecht bis mäßig, wobei EtG und FSEE mit einem Koeffizienten von 0,590 hier die stärkste Abhängigkeit zeigen.

Tabelle 19: Pearson-Korrelation zwischen den Markern

	FSEE sum	CDT	GGT	MCV	ALT	AST
EtG	0,590	0,279	0,525	0,302	0,237	0,399
FSEE sum		0,342	0,505	0,183	0,171	0,262
CDT			0,196	0,292	0,471	0,546
GGT				0,287	0,315	0,419
MCV					0,307	0,344
ALT						0,877

5 Diskussion

5.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Alkoholkonsummarker innerhalb der Konsumgruppen

Alle bestimmten Mittelwerte der Haar- und Blutmarker der Abstinenzler und Normaltrinker lagen innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche oder unterhalb der Cut-off-Werte. Auch die Mittelwerte der Gruppe der Patienten mit chronischem Alkoholabusus repräsentierten sehr gut das erwartete Ergebnis. Bis auf den MCV-Wert lagen alle Werte oberhalb der Cut-off-Werte. Generell lässt sich daran die Tendenz ablesen, dass in beiden Gruppen (also bei allen untersuchten Biomarkern) Probanden, die wenig oder keinen Alkohol tranken, auch als solche erkannt werden konnten. Dies qualifiziert zunächst alle Marker, sowohl die herkömmlichen Blutparameter als auch die Marker der Haaranalyse. Von Vorteil ist dies, wie bereits von anderen Autoren beschrieben, da gerade die Blutmarker durch den jeweiligen Hausarzt generell beispielsweise im Rahmen von Check-up-Untersuchungen zur Kontrolle erhoben werden. Dadurch wird es möglich, zufällig frühzeitig auf den erhöhten Konsum von Alkohol aufmerksam zu werden (1). Die langfristige Abstinenzüberwachung durch Blutmarker im zweiten Schritt ist jedoch nur bedingt möglich, da durch einen erhöhten Alkoholkonsum die Leber und auch andere Organsysteme früher oder später so erheblich geschädigt werden können, dass auch bei Alkoholabstinenz noch erhöhte Werte bzw. Enzymaktivitäten gemessen werden können. Dies beobachtet man z. B. im Rahmen einer durch Alkohol induzierten Leberzirrhose (117, 126).

Dass sich in dieser Arbeit die Tendenz der Werte der jeweiligen Gruppe der Haar- und Blutmarker gleich verhielten, war dem strengen Studiendesign geschuldet. Ausgeschlossen wurden unter den Patienten mit chronischem Alkoholabusus alle Personen, die länger als zwei Wochen abstinent waren. Da die Blutmarker sich innerhalb von maximal zwei bis drei Wochen (Ausnahme MCV: 120 Tage) normalisieren, sind diese bei positivem Testbefund der Haarmarker ebenfalls meist positiv (68, 117).

Der nicht pathologisch veränderte Mittelwert des MCV bei den Patienten mit chronischem Alkoholabusus könnte ursächlich in der geringen Streuung der einzelnen Werte in den Gruppen liegen. Der Wert des MCV weicht weder in der Normaltrinkergruppe noch in der Gruppe der Patienten mit chronischem Alkoholabusus stark ab (+/- 7 %). Hingegen unterschieden sich beispielsweise die Mittelwerte des EtG

in den beiden Gruppen sehr (245 %). Dieser Marker weist ein sehr gutes Diskriminierungsvermögen auf. Dieses zeigen ebenfalls FSEE und GGT (214 %, 232 %). Die gute Performance von GGT deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien (88).

Interessant wäre weiterhin zu untersuchen, wie sich die Mittelwerte und Standardabweichungen insbesondere der Blutmarker im Gegensatz zu den Haarmarkern verhalten würden, wenn bei den Patienten mit chronischem Alkoholkonsum die Abstinenzphase zwei bis drei Wochen übersteigen würde. Denn der häufig für verkehrsmedizinische Fragestellungen geforderte Abstinenznachweis beinhaltet oft mehr als diesen kurzen Zeitraum. Es gilt eine Abstinenzdauer von einem halben oder ganzen Jahr zu belegen. Dafür würden sich Haaranalysen in dreimonatigen Abständen besser eignen als eine Blutanalyse alle zwei Wochen. Der Aufwand für den Probanden würde geringer und das Ergebnis erheblich genauer. Dies wäre für beide Parteien von Vorteil.

5.2 Alkoholkonsummarker: falsch positive Ergebnisse bei Fettsäureethylestern und Ethylglucuronid

132 Personen wurden in dieser Studie anhand ihres in einem Fragebogen selbst angegebenen Alkoholkonsums klassifiziert. Betrachtet man Tabelle 10 und Abbildung 10, wird deutlich, dass generell für fast alle Marker mehr falsch negative als falsch positive Ergebnisse in den hier untersuchten Konsumgruppen zu verzeichnen sind. Folglich wurden nur wenige Menschen mit einem moderaten Alkoholkonsum falsch beurteilt. Dies liegt mitunter an den Grenzwerten, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Als Grenze zwischen normalem Alkoholkonsum und chronischem Alkoholabusus wurden 60 g Ethanol gewählt. Dieser Wert ist etwas höher als in der Literatur oftmals beschrieben. Für die WHO beispielsweise zählt ein Konsum von 60 g Ethanol pro Tag schon längst zu mehr als nur gefährlichem Trinkverhalten (128).

In den meisten Fragestellungen, in denen die Haaranalyse zur Anwendung kommt und in Zukunft kommen soll, geht es darum, einen Beschuldigten eventuell zu entlasten: „Im Zweifel für den Angeklagten“ (127). Daher macht es Sinn, sich nicht unbedingt an der Vielzahl vorgeschlagener Werte und psychologischer Tests zu orientieren. In diesem Zusammenhang geht es selten um die Frage der persönlichen gesundheitlichen Schädigung, sondern objektiv eher um die rechtlichen Konsequenzen.

In der Gruppe der Abstinenzler und Normaltrinker werden tendenziell umso weniger Probanden als falsch positiv erkannt, je geringer der Konsum ist. Umgekehrt werden in der Gruppe der Alkoholentzugspatienten umso weniger Probanden als falsch negativ erkannt, je höher der Alkoholkonsum ist. Dies zeigt eine gewisse Korrelationsmöglichkeit der Menge des aufgenommenen bzw. nicht aufgenommenen Alkohols mit der Höhe der Marker, obgleich es bis heute nicht möglich ist, anhand der Markerhöhe die Höhe des Alkoholkonsums zu bestimmen. In der Literatur konnte für die Blutmarker bisher noch keine lineare Beziehung ermittelt werden. Es existieren nur wenige Studien, die diesen Zusammenhang zumindest für die Haarmarker zeigen konnten (11, 102). Dies könnte allerdings in der Veränderbarkeit durch die unterschiedlichsten Einflussfaktoren begründet sein. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, verändern sich die Blutmarker bzw. ihre Enzymaktivitäten beispielsweise durch verschiedene Krankheiten, Medikamenteneinnahme oder eine Schwangerschaft und differieren teils sogar durch BMI, Alter oder Geschlecht (18, 36, 70, 117, 119, 126). Ebenso lassen sich zwar die Werte der Marker im Haar, z. B. durch Haarkosmetika, verändern (47, 52, 94, 123), jedoch konnte für EtG teilweise gezeigt werden, dass seine Konzentration im Haar mit der Menge an aufgenommenem Alkohol korreliert (11, 74). Ob es tatsächlich möglich ist, eine zuverlässige Korrelation für EtG und FSEE herzustellen, blieb bis heute ungeklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Unter den falsch positiven Ergebnissen sind FSEE als Haarmarker gegenüber EtG bei den gewählten Cut-off-Werten in dieser Studie führend. Dies lässt sich eventuell durch die Vielzahl von Möglichkeiten der Beeinflussung erklären, die bei EtG eher gering gehalten werden kann. Hier seien die Anwendung von ethanolhaltigen Haarpflegeprodukten, die endogene Ethanolproduktion sowie die externe Einlagerung von Ethanol aus der Luft, beispielsweise in Bars, erwähnt (52).

EtG hat in dieser Studie mit nur zwei falsch positiven Ergebnissen im Vergleich zu den anderen Markern am besten abgeschnitten. Ein Normaltrinker, der falsch positiv getestet wurde, wies ebenfalls erhöhte FSEE- und CDT-Befunde auf und gab einen durchschnittlichen Alkoholkonsum von 36 g/Tag an. Es erscheint in diesem Fall durchaus denkbar, dass der tatsächliche Konsum deutlich höher lag, als in der Befragung angegeben wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit der bisherigen Literatur überein, da dort fast keine falsch positiven Befunde zu finden sind (47, 87). In nur einem Fall war das Ergebnis falsch positiv. Diese Tatsache konnte dadurch erklärt und entkräftet werden, dass das verwendete Haarpflegeprodukt EtG enthielt (120). Eine

andere Normaltrinkerin, die als falsch positiv charakterisiert wurde, wies ansonsten keine falsch positiven Werte auf und hatte einen eher niedrigen Alkoholkonsum von nur 18 g/Tag angegeben. Die Probandin äußerte ebenfalls, verschiedenste Haarpflegeprodukte zu verwenden, und daher erscheint es denkbar, dass auch hier der Wert, wie oben beschrieben, durch ein EtG-haltiges Haarpflegeprodukt künstlich erhöht wurde.

Folglich ist es sinnvoll, die FSEE mit beispielsweise dem EtG zu kombinieren, um die Zahl der falsch positiven Ergebnisse zu vermindern. Ebenfalls ist die gute Dokumentation der externen Einflüsse auf die Haare notwendig.

Vergleicht man am Ende noch die Gesamtheit aller Blutmarker mit dem EtG (Haarmarker), fällt schnell auf, dass bei allen 5 untersuchten Blutmarkern sowohl die Anzahl der einzelnen falsch positiven Ergebnisse als auch die Anzahl der falsch negativen Ergebnisse jeweils höher ist. Damit geht aus einem einfachen Vergleich schon zu Anfang hervor, dass in der Untersuchung des EtG-Wertes ein großes Potenzial liegt, die zu Beginn erwähnten Fragestellungen zufriedenstellend zu beantworten. Dies untermauern mittlerweile auch andere Studien zu diesem Thema (133). Es wäre jedoch wünschenswert, einen zweiten Langzeitmarker zu haben, der dieses Ergebnis zusätzlich bestätigt, um das Reputationsrisiko dieses Tests zu senken und damit die Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

Die hierfür vorgesehenen Haarmarker FSEE schnitten im Vergleich zu dem sehr starken EtG schlechter ab und zeigten in allen möglichen Fällen mehr falsche Ergebnisse. Somit kann dieser Marker nur eingeschränkt forensisch beweissicher alleine verwendet werden. FSEE sollten nur unter der genauen Betrachtung von möglichen Fehlerquellen, wie dem Einfluss von Haarkosmetika oder der externen Einlagerung von Ethanol ins Haar, benutzt werden. Dies könnte die wenigen falschen Ergebnisse des EtG-Wertes entkräften.

5.3 ROC-Kurven-Analyse

Für alle Biomarker war in Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche die Sensitivität niedriger als die Spezifität; dies konnten andere, teils größere Studien ebenfalls nachweisen (88). Somit konnten immer jeweils mehr richtig positive Fälle als falsch positive Fälle anhand dieser Marker identifiziert werden. In Tabelle 13 und anhand Abbildung 11 lässt sich erkennen, dass unter Verwendung der angegebenen Grenzwerte mittels EtG (83,3 %), GGT (80,55 %)

und FSEE sum (72,2 %) am meisten Probanden, welche pro Tag 60 g Ethanol oder mehr zu sich nahmen, als richtig positiv bewertet wurden. Auch klassifizierten EtG und GGT nur sehr wenige der Abstinenzler und Normaltrinker als falsch positiv (2,6 % und 7,05 %). FSEE sum schnitt im Vergleich zu anderen Studien etwas schlechter ab. Wurst et al. publizierten 2004 eine Studie mit einer Sensitivität von 94,4 % und einer Spezifität von 90 % für einen Cut-off-Wert von 0,46 ng/mg (129). Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Entscheidungsgrenze liegt mit 0,675 ng/mg über dem mit 0,5 ng/mg empfohlenen Wert. Darauf bezogen konnte nur eine Sensitivität von 72,2 % und eine Spezifität von 79,5 % erreicht werden (20,5 % der Abstinenzler bzw. Normaltrinker wurden falsch positiv klassifiziert). Die nur geringe Spezifität könnte mit der bereits in anderen Studien erwähnten endogenen Alkoholproduktion zusammenhängen. Hier wurde gezeigt, dass auch Abstinenzler FSEE-sum-Konzentrationen im Haar aufweisen (15). Zudem ist es durchaus möglich, dass nicht angegebene, verwendete Haarkosmetika ebenfalls Einfluss auf das falsche Ergebnis der Fälle hatten (39, 47, 52, 94, 105). Die Verwendung einer höheren Entscheidungsgrenze minimiert die Zahl der falsch positiven Testergebnisse.

AST, ALT und CDT boten in dieser Studie eine etwa vergleichbare, aber unbefriedigende Sensitivität (57,4 %, 58,3 %, 59,3 %), die zudem auch noch teilweise schlechter ausfiel als in vergleichbaren vorherigen Untersuchungen (64, 66). Auch vergleichbar waren die Flächen unter den Kurven von AST, ALT und MCV (0,802, 0,808, 0,803).

In der Studie der WHO/ISBRA lag die Sensitivität von CDT mit 60 % (Männer > 80 g Ethanol/Tag) ebenfalls niedriger als die Sensitivität von GGT mit 67 % (Männer > 80 g Ethanol/Tag). Für Frauen (> 40 g Ethanol/Tag) lagen die Sensitivitäten noch niedriger: CDT 29 % < GGT 44 % (36). Somit war die Performance von CDT, richtig positive Fälle als solche zu klassifizieren, in diesen Studien vergleichbar schlecht und ebenfalls wiederholt schlechter als die von GGT. Dass die Werte der weiblichen Probanden in der WHO/ISBRA-Studie niedriger waren, liegt sehr wahrscheinlich an der Trinkmenge an Alkohol, die in dieser Studie bei 40 g Ethanol pro Tag lag. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Trinkmenge pro Tag wegen der besseren Vergleichbarkeit sowohl für Männer als auch für Frauen auf mindestens 60 g Ethanol oder mehr pro Tag festgelegt.

Die Spezifität der GGT konnte durch diese Studie im Vergleich zu der WHO/ISBRA-Studie leicht angehoben werden (von 90 % bei Frauen und 74 % bei Männern auf

zusammen 92,95 %). Dass in dieser Studie kein Unterschied zwischen Männern und Frauen berücksichtigt wurde, liegt daran, dass keiner dieser Marker positiv mit dem Geschlecht korrelierte. Somit konnte im Gegensatz zu anderen Beiträgen kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Höhe des jeweiligen Wertes festgestellt werden (12, 46, 61, 72, 74, 92).

Im Gegensatz zu dieser sowie der WHO/ISBRA-Studie steht die größte russische Untersuchung, bei der CDT unter allen Blutmarkern mit einer Sensitivität von 67 % und einer Spezifität von 71 % am besten abschneidet. Hier lag die aufgenommene Menge an Alkohol jedoch bei 40 g Ethanol pro Tag (88). Möglicherweise bedeutet dies, dass die regelmäßige Aufnahme einer geringeren Menge Alkohol das CDT sensitiver beeinflusst als das GGT.

MCV hat mit 18,5 % die geringste Sensitivität. Dies deckt sich mit anderen Studien, welche zu ähnlichen Resultaten mit Sensitivitäten von 22-67 % gelangen (113, 129). Eine mögliche Begründung liegt in der vorher gezeigten geringen Streubreite dieses Markers. Der Wert variiert fast ausschließlich innerhalb des Referenzbereiches, folglich wird eine Spezifität von 100 % in dieser Studie erreicht. Damit ist die Anwendbarkeit dieses Markers infrage gestellt.

EtG zeigte in dieser Studie, wie auch in ähnlichen vergleichenden Untersuchungen, die beste Performance mit einer Sensitivität von 83,3 %, einer Spezifität von 97,4 % und einer Fläche unter der ROC-Kurve von 0,941. Die etwas höhere Sensitivität von Kharbouche et al. (72) (95 %, 97 %) lässt sich möglicherweise unter anderem durch den etwas niedriger gewählten Cut-off-Wert von nur 25 pg/mg in deren Studie erklären. Der entsprechende Cut-off-Wert im vorliegenden Beitrag lag bei 28 pg/mg.

Zusammenfassend wären für den Nachweis einer Abstinenz am besten EtG und GGT geeignet. Jedoch liegt der Zeitrahmen für den Nachweis von EtG bei ca. drei Monaten rückwirkend und der für GGT bei etwa zwei bis drei Wochen (117). Daher wäre es sinnvoller, die beiden in dieser Arbeit untersuchten Haarmarker EtG und FSEE sum zu kombinieren. Für diese Kombination wurde von Hastedt et al. 2012 ein Schema vorgeschlagen (58).

Alle anderen betrachteten Biomarker führten ohne Kombination zu hohen falsch positiven Ergebnissen und sind daher für den einzelnen Patienten/Probanden nicht von Vorteil.

5.4 Kombinierte Interpretation der Haarmarker Ethylglucuronid und Fettsäureethylester

Die kombinierte Interpretation von EtG und FSEE sum nach dem Schema von Hastedt et al. (58) ergab unter den 78 Normaltrinkern 62 (79,5 %) richtig negativ klassifizierte Probanden. Beide Marker lassen sich durch diverse Haarpflegeprodukte auf unterschiedliche Weise verändern: FSEE sum kann durch die normale Anwendung FSEE enthaltender Haarpflegeprodukte und externe Einlagerungen von Ethanol bis auf Werte, wie sie bei chronisch exzessivem Alkoholkonsum gemessen werden, erhöht werden (47, 52). Die Konzentration von EtG im Haar kann durch häufiges und intensives Waschen mit Shampoo oder durch Bleichen der Haare vermindert werden (94, 123). Jedoch wird die Konzentration des EtG im Haar nicht durch Ethanol enthaltende Haarpflegeprodukte beeinflusst (47, 87) und der FSEE-Summenwert wird durch Bleichen oder Färben nicht wesentlich verändert (123). Haarspray hat keinen Einfluss auf den EtG-Wert (123). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich FSEE und EtG nahezu komplementär zueinander beeinflussen lassen. Daher ist es sinnvoll, diese beiden Werte zu bestimmen, um die jeweiligen Einflussfaktoren zu detektieren.

Unter Anwendung der vorgeschlagenen Kombination ergeben sich von den 54 Probanden mit chronischem Alkoholmissbrauch 43 (79,6 %) richtig positiv klassifizierte Probanden.

Vergleicht man die kombinierte Sensitivität von FSEE und EtG von 79,6 % mit den einzelnen Sensitivitäten von FSEE sum (72,2 %) und EtG (83,3 %) der vorherigen ROC-Kurven-Analyse, so wird ersichtlich, dass die generelle Anzahl der richtig positiv erkannten Probanden zwar leicht vermindert ist, die Sensitivität für FSEE zusammen mit EtG betrachtet jedoch leicht verbessert wurde. Hier wurden aktuell nicht die Probanden berücksichtigt, deren Werte erneut geprüft werden sollten. Daher wäre es bei diesen Probanden durchaus denkbar, dass bei erneuter Testung die Sensitivität erhöht werden könnte - zumindest wenn es sich bei den Unstimmigkeiten um Messfehler handeln sollte. Somit erscheint in diesem Falle eine kombinierte Interpretation sinnvoll, wenn man Proben zurückbehält und eine erneute Testung erfolgen kann. Dem wird unter forensischen Maßstäben durch die Abnahme von Rückstellproben Rechnung getragen.

5.4.1 Proband MB 47

Der Proband MB 47 wurde nach der Angabe seines täglichen Alkoholkonsums von ca. 35,6 g in die Gruppe der Normaltrinker eingeordnet. Anhand der kombinierten Interpretation von EtG und FSEE sum zeigte er einen starken Hinweis auf Alkoholmissbrauch mit einem EtG-Wert von 54 pg/mg und einem FSEE-sum-Wert von 0,803 ng/mg. Auch das CDT war mit 4,1 % pathologisch. Alle anderen Biomarker im Blut lagen im Normalbereich.

Aufgrund der Erhöhung beider Haarmarker und zusätzlich des CDT ist davon auszugehen, dass dieser Proband mehr Alkohol pro Tag zu sich genommen hat, als auf dem Fragebogen angegeben war. Daher sollte dieser Proband auch nicht als falsch negativ klassifiziert werden, sondern als richtig positiv. Ungenauigkeiten bei selbst angegebenen Daten, wie beispielsweise Untertreibungen, führen folglich zu einer schlechteren Korrelation zwischen der Trinkmenge und den untersuchten Markern (40, 51).

Dass die Marker wie AST, ALT und MCV dies nicht belegen konnten, liegt möglicherweise, wie bereits in dieser Studie nachgewiesen, an ihrer eher niedrigen Sensitivität (57,4 %, 58,35 %, 18,5 %). Auch GGT, welches eine mit EtG vergleichbare Sensitivität aufweist (80,5 %), konnte in diesem Fall nicht als Beleg für erhöhten Alkoholkonsum herangezogen werden.

5.4.2 Proband MB 78

Der Proband MB 78 wurde ebenfalls nach der Angabe seines täglichen Alkoholkonsums von ca. 47,9 g der Gruppe der Normaltrinker zugeordnet. Auch dieser Proband wies in der kombinierten Interpretation mit einem EtG-Wert von 20 pg/mg und einem FSEE-sum-Wert von 1,531 ng/mg einen Hinweis auf Alkoholmissbrauch auf. Alle anderen Biomarker im Blut waren jedoch nicht pathologisch.

Betrachtet man daher den EtG-Wert von 20 pg/mg genauer, so ist dieser Wert prinzipiell zunächst einzeln als nicht pathologisch einzustufen (Cut-off-Wert 28 pg/mg). Dem gegenüber steht der extrem erhöhte FSEE-sum-Wert. Zwar gab der Proband bei der Frage keine besonderen Haarpflegeprodukte an, in diesem Fall erscheint es jedoch äußerst plausibel, dass nicht angegebene Haarpflegeprodukte, wie beispielsweise Haarspray, oder unbekannte externe Einlagerung, wie z. B. durch das häufige Aufhalten in Bars, für einen derartig erhöhten Wert verantwortlich sind. Dies wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (39, 47, 52).

5.4.3 Proband MBK 23

Der Proband MBK 23 gab einen durchschnittlichen Alkoholkonsum von 90 g pro Tag an und wurde damit der Gruppe der Patienten mit chronischem Alkoholkonsum zugeordnet. Die Interpretation der beiden Werte für die Haarmarker (EtG nicht nachweisbar, FSEE sum 0,430 ng/mg) führte zu dem Ergebnis, dass der Patient weder abstinent war noch chronischen Alkoholmissbrauch betrieb, sondern nur mäßig Alkohol trank. Demgegenüber standen die Blutwerte. Bis auf den Wert des MCV waren alle Parameter pathologisch verändert. Der MCV-Wert ist jedoch mit einer Sensitivität von 18,5 % als nicht aussagekräftig zu betrachten.

In diesem Fall der Haaranalyse könnte die Ursache der negativen Werte die Verwendung von Achselhaaren anstatt von Kopfharen gewesen sein. Hartwig et al. stellten schon 2003 fest, dass die Alkoholkonzentration von FSEE sum in beispielsweise Achselhaaren von Individuen geringer war als die Alkoholkonzentration in ihren Kopfharen (53).

5.4.4 Proband MBK 66

Der Proband MBK 66 gab in dem Fragebogen einen täglichen Alkoholkonsum von 120 g an und galt somit als Proband mit chronischem Alkoholabusus. Die kombinierte Interpretation stufte auch diesen Probanden mit einem nicht nachweisbaren EtG-Wert und einem FSEE-sum-Wert von 0,484 ng/mg als mäßigen Trinker ein. Demgegenüber standen die pathologischen Werte bzw. pathologisch erhöhten Enzymaktivitäten von AST, ALT und GGT.

In diesem Fall gibt es keine plausible Erklärung für die beiden niedrigen Haarmarker. Allenfalls der EtG-Wert könnte durch nicht angegebenes Bleichen oder durch häufiges Shampooieren verringert worden sein. Möglicherweise wurde hier die Einnahme von Medikamenten verschwiegen und so die Enzymaktivität nicht objektiv nachprüfbar verändert. Es könnte sich eventuell auch um einen Messfehler handeln.

5.4.5 Proband MBK 72

Der Proband MBK 72 gab einen täglichen Alkoholkonsum von 182 g an und zählte somit zu den Probanden mit chronisch exzessivem Alkoholkonsum. Auch seine Werte von EtG (4 pg/mg) und FSEE sum (0,298 ng/mg) stuften ihn als Probanden mit nur mäßigem Alkoholkonsum ein. Dagegen sprach der pathologisch erhöhte Wert der GGT.

Auch in diesem Fall fiel es schwer, eine plausible Erklärung zu finden, und daher entspricht dieser Erklärungsversuch dem von Proband MBK 66.

5.4.6 Proband MBK 11

Der Proband MBK 11 gab eine tägliche Trinkmenge von 66 g Ethanol pro Tag an und zählte damit zu der Gruppe der Patienten mit chronischem Alkoholkonsum. Seine Werte von EtG (20 pg/mg) und FSEE sum (0,329 ng/mg) stufen ihn anhand der kombinierten Interpretation als mäßigen Trinker ein. Bis auf die sehr gering erhöhte Enzymaktivität der AST (48 U/L) sind alle anderen Marker im Blut ebenfalls negativ. Es ist davon auszugehen, dass dieser Proband eventuell etwas weniger trinkt, als für eine Veränderung der Werte in einen pathologischen Bereich nötig wäre. Immerhin lag er mit 66 g Ethanol pro Tag nur 6 g über der Grenze, die in dieser Arbeit als Unterscheidungsgrenze zwischen Abstinenzlern bzw. Normaltrinkern und Patienten mit chronischem Alkoholabusus gewählt wurde.

5.4.7 Proband MBK 62

Der Proband MBK 62 trank pro Tag nach eigenen Angaben durchschnittlich 210 g Ethanol und zählte in dieser Studie ebenfalls zu den Patienten mit chronischem Alkoholabusus. Die kombinierte Interpretation von EtG und FSEE sum (23 pg/mg, 0,375 ng/mg) beurteilt den Probanden jedoch als Person mit mäßigem Alkoholkonsum. Ebenfalls negativ sind die Werte von MCV und CDT. Hingegen befinden sich die Enzymaktivitäten von AST, ALT und GGT im pathologischen Bereich. Bei diesem Probanden könnte eine Ursache des unklaren bzw. falsch negativen Ergebnisses die Verwendung von Beinhaaren für die Analyse sein.

5.5 Optimierte Cut-off-Werte bzw. Obergrenzen der Normbereiche für verbesserte Sensitivitäten und Spezifitäten der Biomarker

Durch die Optimierung der Cut-off-Werte bzw. der Obergrenzen der Normbereiche, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, ließ sich bei vier (FSEE sum, GGT, AST und ALT) der sieben Marker die Spezifität erhöhen, also die Zahl derer, die unter den Normaltrinkern als falsch positiv klassifiziert wurden, deutlich vermindern. Bei den restlichen drei Markern blieb die Spezifität gleich (EtG, CDT und MCV).

Der von der Society of Hair Testing 2012 vorgeschlagene Cut-off-Wert von 30 pg/mg für EtG konnte in dieser Studie mit 28 pg/mg in etwa bestätigt werden (76). 2010

veröffentlichte die SoHT zusätzlich einen Cut-off-Wert für FSEE sum von 0,5 ng/mg (75). Wenn auch in dieser Studie ein wenig höher liegend (0,675 ng/mg), konnte diese Größenordnung ebenfalls in etwa bestätigt werden. Tendenziell zu diskutieren wäre eine eventuelle Anhebung des Cut-off-Wertes von FSEE sum auf 1,0 ng/mg, wie von Hastedt et al. in einer 2013 erschienenen Studie mit insgesamt 1057 Sektionsfällen vorgeschlagen (56). Dies könnte in Kombination mit dem Marker EtG in Zukunft zu zuverlässigeren Ergebnissen führen.

Auch die Obergrenzen der Normbereiche der Biomarker im Blut ähnelten stark den vorgegebenen Referenzbereichen der Klinik. Jedoch ist zu beachten, dass jedes Labor aufgrund unterschiedlicher Geräteeichungen etwas abweichende Werte herausgibt.

5.6 Systematische Fehler durch verschiedene Einflussgrößen in Korrelation mit den untersuchten Markern

In keinem Fall konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Geschlecht, dem Alter, dem Körpergewicht, der Körpergröße, der Haarfarbe und der Neigung zum Schwitzen festgestellt werden. Ein störender Einfluss durch diese Größen ist demnach nicht anzunehmen.

Das unausgewogene Verhältnis von weiblichen und männlichen Probanden ist dem prospektiven Studiendesign geschuldet. Ein relevanter Einfluss auf die Ergebnisse war nach vorliegender Studienlage für die untersuchten Biomarker nicht zu erwarten.

Im Fall von EtG stützt dies die früheren Studien, in denen diese Marker ebenfalls nicht durch das Gewicht, die Körpergröße oder die Haarfarbe beeinflusst wurden (12, 72, 74, 92).

Bei dem Summenwert von FSEE konnten ebenfalls frühere Studien bestätigt werden, in denen die Haarfarbe für das Ergebnis der Untersuchung keine Rolle spielt (80).

Für GGT hingegen wurde in der Vergangenheit mehrmals nachgewiesen, dass sich die Enzymaktivität durch das Geschlecht, das Alter oder das Gewicht beeinflussen lässt (61). In dieser Studie konnte jedoch kein signifikanter, relevanter Einfluss durch Alter oder Gewicht sowie die anderen in Tabelle 18 angeführten Marker festgestellt werden.

Für CDT fand man in früheren Studien, dass Größen wie das Geschlecht, das Alter, die Körpergröße oder das Gewicht Einfluss auf die Höhe des Wertes haben (46). Das konnte durch diese Studie nicht belegt werden. Es konnte im untersuchten

Probandenkollektiv kein signifikanter Zusammenhang zwischen CDT und diesen Größen festgestellt werden.

Da kein Proband die Einnahme von Medikamenten mit einer bekannten beeinflussenden Wirkung auf die untersuchten Marker sowie Enzymaktivitäten angab, erfolgte unter diesem Aspekt keine gesonderte Betrachtung der Fälle.

FSEE werden als stark lipophile Moleküle über das Sebum in das Haar eingelagert. EtG wird über das Blut in die Haare eingelagert. Als hydrophiles Molekül wird EtG auch über den Schweiß ausgeschieden. Zudem kann aufgenommener Trinkalkohol in geringem Maße ebenfalls über den Schweiß ausgeschieden werden. Ein möglicher verfälschender Einfluss durch übermäßiges Schwitzen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

5.7 Pearson-Korrelation zwischen den untersuchten Markern

Die stärkste Korrelation haben die Enzymaktivitäten der Marker AST und ALT zueinander gezeigt. Dies liegt höchstwahrscheinlich an dem sehr ähnlichen Bildungs- und Freisetzungsweg, wobei die überwiegend im Cytosol vorliegende ALT bereits bei geringeren Leberparenchymschäden eine messbar erhöhte Aktivität zeigt, wohingegen die überwiegend in Mitochondrien gebundene AST erst bei Zellnekrose eine messbar erhöhte Aktivität zeigt. Alle anderen Korrelationen waren gering bis mäßig stark. Dahingegen zeigten EtG und FSEE sum eine relativ starke Korrelation von 0,590 zueinander. Vermutlich liegt dies daran, dass es sich bei beiden Substanzen um Haarmarker handelt und die beeinflussenden Faktoren in dieser Arbeit durch konsequenten Probandenausschluss so gering wie möglich gehalten worden sind.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ziel dieser Studie mit insgesamt 132 Probanden war es, durch einen Vergleich der klassischen indirekten Alkoholkonsummarker (AST, ALT, GGT, MCV und CDT) im Blut mit den direkten Alkoholkonsummarkern (EtG, FSEE) im Haar zu zeigen, dass die direkten Marker gegenüber den indirekten Markern Vorteile aufweisen oder zumindest vergleichbare Aussagen zum Alkoholkonsumverhalten zulassen.

Aktuell existiert eine Vielzahl an Biomarkern, um übermäßigen Konsum von Alkohol nachzuweisen. Sie alle weisen unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten auf. Der Beleg einer Abstinenz bzw. eines normalen Trinkverhaltens ist mit den verfügbaren Markern schwierig. Insbesondere für den Abstinenznachweis existieren in der Klinik bisher wenige Marker mit einer ausreichend hohen Spezifität. Die üblicherweise verwendeten Blutalkoholmarker AST, ALT, GGT, MCV und CDT haben zudem eine relativ kurze Halbwertszeit von nur zwei bis drei Wochen (nur bei MCV 120 Tage) und geben somit lediglich Auskunft über einen relativ kurzen Zeitraum. Zudem ist die pathologische Veränderung dieser Werte durch Erkrankungen und Medikamenteneinnahme leicht zu beeinflussen. Um diese Störfaktoren zu minimieren, wurden in den letzten Jahren vorwiegend vor forensischem Hintergrund die direkten Haarmarker etabliert. In dieser Studie wurden EtG und FSEE im Vergleich mit den herkömmlichen Markern genauer untersucht. Auch diese Marker bieten Möglichkeiten der falschen Interpretation. Diese ist jedoch bei EtG eher gering. Zudem verringert die Kombination der beiden Haarmarker die Zahl der falsch positiven Ergebnisse, da sich beide Marker unterschiedlich beeinflussen lassen.

Aufgrund des strengen Studiendesigns mit einem maximalen Abstinenzbeginn von zwei Wochen vor der Blutentnahme konnte die Untersuchung zunächst zeigen, dass sich alle untersuchten Marker tendenziell anhand aktuell in der Literatur vorgeschlagener Cut-off-Werte bzw. Referenzbereiche für den Nachweis von überhöhtem Alkoholkonsum eignen. Systematische Fehler durch Einflussgrößen wie Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Körpergröße, Haarfarbe sowie die Neigung zum Schwitzen können ausgeschlossen werden. Auch beeinflussen sich die untersuchten Größen nicht untereinander. Lediglich eine Korrelation zwischen EtG und FSEE lässt sich nachweisen. EtG und FSEE fielen durch ein relativ gutes Diskriminierungsvermögen im Vergleich zu den indirekten Markern im Blut auf.

Für den Nachweis von normalem Trinken offenbarte sich, dass bei der im Vergleich zu anderen Studien relativ hoch gewählten Grenze von 60 g Ethanol oder mehr pro Tag zur Unterscheidung der Konsumgruppen fast alle Marker deutlich mehr Personen als falsch negativ klassifizierten als umgekehrt.

FSEE stehen dem entgegen, da sie die meisten falsch positiven Ergebnisse zeigten. Dies liegt mitunter an der Beeinflussung durch die endogene Bildung im Körper und an externen Einflüssen. Dafür ist die Dokumentation von wichtigen Einflussfaktoren durch einen Fragebogen, wie in dieser Arbeit verwendet, von entscheidendem Vorteil. Es wäre weiterhin sinnvoll, den aktuellen Cut-off-Wert für FSEE sum auf 1,0 ng/mg zu erhöhen, wie es bereits in anderen Studien vorgeschlagen wurde.

Ein Beleg der Alkoholabstinenz gelingt mit keinem der betrachteten Biomarker. Daher gelingt eine Unterscheidung zwischen Abstinenzlern und Normaltrinkern anhand des Studiendesigns nicht. Es kann lediglich festgestellt werden, dass keine Hinweise auf einen erhöhten Alkoholkonsum bestehen, wenn die ermittelten Normwerte und Entscheidungsgrenzen nicht überschritten werden.

Alle untersuchten Marker bis auf EtG liegen auch bei Alkoholabstinenzlern in messbaren Konzentrationen vor.

Im Vergleich von EtG im Haar mit den Markern im Blut schneiden letztere schlechter ab, da sie mehr falsch positive und falsch negative Ergebnisse liefern.

Im Falle des EtG liegt die momentan analytisch erreichte Nachweisgrenze sehr niedrig. Möglicherweise liegt hier Potenzial, die Gruppe der Normaltrinker von den Abstinenzlern zu unterscheiden. In der vorliegenden Studie zeigt sich das bei der geringen Fallzahl allerdings nicht, da auch Normaltrinker teilweise unter der Nachweisgrenze lagen.

Um den Fehler in Zukunft zu minimieren, sollte zum Nachweis längerer Abstinenz besonders in der Forensik die Kombination der Werte von EtG und FSEE angestrebt werden, da sich die Blutmarker aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit nicht zur Kombination eignen. Zudem ist die dreimonatliche Vorstellung zur Haarentnahme, z. B. bei dem zu erbringenden Nachweis der Abstinenz aufgrund eines Fahrverbots, eindeutig praktikabler, sowohl für den Untersucher als auch für den Probanden. Die möglichen Fehlerquellen sollten anhand eines Fragebogens ausgeschaltet werden, um so die wenigen falschen EtG-Ergebnisse zu entkräften. Diese Erkenntnis geht auch aus der Auswertung der Daten anhand des dafür entwickelten Modells hervor.

Durch die alle zwei Jahre neu überarbeiteten Richtlinien der SoHT, durch Ergänzung von Daten aus vorherigen Studien und neu evaluierte Cut-off-Werte wird die Anwendbarkeit der Haarmarker insgesamt in den Vordergrund gerückt.

7 Literaturverzeichnis

1. Aalto M, Seppa K. Use of laboratory markers and the audit questionnaire by primary care physicians to detect alcohol abuse by patients. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2005. 40;6: 520-523.
2. Agelink MW, Dirkes-Kersting A, Zeit T, et al. Sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in relation to age and duration of abstinence. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1998. 33;2: 164-167.
3. Agius R, Nadulski T, Kahl HG, et al. Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. *Forensic Sci Int*, 2010. 196;1-3: 3-9.
4. Agius R, Kintz P. Guidelines for European workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug testing and analysis*, 2010. 2;8: 367-376.
5. 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. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. 396;7: 2441-2447.
6. Albermann ME, Musshoff F, Madea B. Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. 400;1: 175-181.
7. Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2000. 35;3: 313-314.
8. Anton RF, Lieber C, Tabakoff B. Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase for the detection and monitoring of alcohol use: results from a multisite study. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002. 26;8: 1215-1222.
9. Anttila P, Jarvi K, Latvala J, Blake JE, Niemela O. A new modified gamma-%CDT method improves the detection of problem drinking: studies in alcoholics with or without liver disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2003. 338;1-2: 45-51.
10. Anttila P, Jarvi K, Latvala J, Niemela O. Method-dependent characteristics of carbohydrate-deficient transferrin measurements in the follow-up of alcoholics. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2004. 39;1: 59-63.

11. Appenzeller BM, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci Int*, 2007. 173;2-3: 87-92.
12. Appenzeller BM, Schuman M, Yegles M, Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2007. 42;4: 326-327.
13. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem*, 2001. 47;1: 13-27.
14. Auwärter V. Dissertation: Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums - Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Institut für Rechtsmedizin der Charité, Berlin. 2006.
15. Auwärter V, Sporkert F, Hartwig S, et al. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Clin Chem*, 2001. 47;12: 2114-2123.
16. Bätzing S. Suchtstoffe und Suchtformen. *Drogen- und Suchtbericht 2009*. 2009. 5. April 2012, http://www.drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Presse/Downloads/12-05-22_DrogensuchtBericht_2012.pdf.
17. Bätzing S. Suchtstoffe und Suchtformen. *Drogen- und Suchtbericht 2012*. 2012. 8. August 2012, http://www.drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Presse/Downloads/12-05-22_DrogensuchtBericht_2012.pdf.
18. Bakhireva LN, Cano S, Rayburn WF, et al. Advanced Gestational Age Increases Serum Carbohydrate-Deficient Transferrin Levels in Abstinent Pregnant Women. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2012.
19. Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, et al. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int*, 2008. 176;1: 76-81.
20. Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Biomedical applications*, 1996. 675;2: 189-196.

21. Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A, Arfini C, Vidali M. Use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and a combination of GGT and CDT (GGT-CDT) to assess heavy alcohol consumption in traffic medicine. *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 2010. 45;3: 247-251.
22. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2001. 2002. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D2.html?__nnn=true&.=
23. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2002. 2003. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D3.html?__nnn=true.
24. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2003. 2004. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D3.html?__nnn=true.
25. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2004. 2005. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D2.html?__nnn=true.
26. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2005. 2006. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D2.html?__nnn=true.
27. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2006. 2007. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D2.html?__nnn=true.
28. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2007. 2008. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D2.html?__nnn=true.
29. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2008. 2009. 7. April 2012,

- http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D1.html?__nnn=true.
30. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2009. 2010. 7. April 2012, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D1.html?__nnn=true.
 31. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2010. 2011. 7. Mai 2013, http://www.bka.de/nn_242508/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/AeltereAusgaben/aeltereAusgaben__node,gtp=242514__3D1.html?__nnn=true.
 32. Bundesministerium des Inneren. Polizeiliche Kriminalstatistik Bundesrepublik Deutschland 2011. 2012. 12. Mai 2013, http://www.bmi.bund.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/2012/PKS2011.pdf?__blob=publicationFile.
 33. Chen J, Conigrave KM, Macaskill P, Whitfield JB, Irwig L. Combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase to increase diagnostic accuracy for problem drinking. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2003. 38;6: 574-582.
 34. Concheiro M, Cruz A, Mon M, et al. Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol*, 2009. 33;3: 155-161.
 35. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction (Abingdon, England)*, 2003. 98 Suppl 2; 31-43.
 36. Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, et al. CDT, GGT and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002. 26;3: 332-339.
 37. Cooper GA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int*, 2012. 218;1-3: 20-24.
 38. Dahl H, Stephanson N, Beck O, Helander A. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Toxicol*, 2002. 26;4: 201-204.
 39. De Giovanni N, Donadio G, Chiarotti M. Ethanol contamination leads to fatty acid ethyl esters in hair samples. *J Anal Toxicol*, 2008. 32;2: 156-159.

40. Delaney-Black V, Chiodo LM, Hannigan JH, et al. Just say "I don't": lack of concordance between teen report and biological measures of drug use. *Pediatrics*, 2010. 126;5: 887-893.
41. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. Alkohol Daten und Fakten. 2013. 28. Dezember 2013, <http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
42. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS). Alkohol Daten und Fakten. 10. Oktober 2010, www.dhs.de/web/datenfakten/alkohol.php.
43. Devgun MS, Dunbar JA, Hagart J, Martin BT. Alcohol intake and liver function tests. *Ann Clin Biochem*, 1985. 22 (Pt 1); 104-105.
44. Dolman JM, Hawkes ND. Combining the audit questionnaire and biochemical markers to assess alcohol use and risk of alcohol withdrawal in medical inpatients. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2005. 40;6: 515-519.
45. Falbe J, Regitz M. *Römpp Chemie Lexikon*. Thieme Verlag, Stuttgart. 1995.
46. Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004. 28;9: 1347-1355.
47. Gareri J, Appenzeller B, Walasek P, Koren G. Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. 400;1: 183-188.
48. Gassmann R, Kepp J. Alkohol. *Jahrbuch Sucht 2012*. 2012. 5. April 2013, <http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
49. Gerhards P, Bons U, Sawazki J, Szigan J, Wertmann A. *GC/MS in Clinical Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. 1999.
50. Goll M, Schmitt G, Ganssmann B, Aderjan RE. Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution. *J Anal Toxicol*, 2002. 26;5: 262-266.
51. Harrell AV. The validity of self-reported drug use data: the accuracy of responses on confidential self-administered answered sheets. *NIDA Res Monogr*, 1997. 167; 37-58.
52. Hartwig S, Auwärter V, Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int*, 2003. 131;2-3: 90-97.

53. Hartwig S, Auwärter V, Pragst F. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 2003. 38;2: 163-167.
54. Hartwig S. Dissertation: Fettsäureethylester als Alkoholmarker im Haar von Abstinenzlern, Normaltrinkern und Todesfällen mit Alkoholanamnese sowie Einflüsse von kosmetischer Haarbehandlung. Med. Fakultät Charité, Humboldt Universität Berlin. 2004.
55. Hasselblatt M, Martin F, Maul O, Ehrenreich H, Kernbach-Wighton G. Persistent macrocytosis following abstinence from chronic alcohol use. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2001. 286;23: 2946.
56. Hastedt M, Bossers L, Krumbiegel F, Herre S, Hartwig S. Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluation of 1,057 autopsy cases. *Forensic science, medicine, and pathology*, 2013. 9;2: 184-193.
57. Hastedt M. Dissertation: Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Marker eines chronisch erhöhten Alkoholkonsums. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. 2013.
58. Hastedt M, Herre S, Pragst F, Rothe M, Hartwig S. Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair. *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 2012. 47;2: 127-132.
59. Hayashi S, Miyamoto I, Takeda K. Measurement of human hair growth by optical microscopy and image analysis. *The British journal of dermatology*, 1991. 125;2: 123-129.
60. Helander A, Beck O, Jones AW. Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin Chem*, 1996. 42;4: 618-624.
61. Helander A, Tabakoff B. Biochemical markers of alcohol use and abuse: experiences from the Pilot Study of the WHO/ISBRA Collaborative Project on state and trait markers of alcohol. *International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 1997. 32: 133-144.
62. Herold G. *Herold Innere Medizin 2012*. Gerd Herold. 2011.
63. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart. 1991.

64. Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Niemela O. Comparison of the combined marker GGT-CDT and the conventional laboratory markers of alcohol abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2006. 41;5: 528-533.
65. Hillman A, Sykes RA, McConnell AA. Limitations in the use of gamma-glutamyl transferase estimations in alcohol-dependent subjects. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1998. 33;6: 626-630.
66. Hoiseth G, Morini L, Polettini A, Christophersen A, Morland J. Ethyl glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers - a pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009. 33;5: 812-816.
67. Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int*, 2002. 128;1-2: 59-65.
68. Joya X, Friguls B, Ortigosa S, et al. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review. *J Pharm Biomed Anal*, 2012.
69. Jurado C, Soriano T, Gimenez MP, Menendez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Sci Int*, 2004. 145;2-3: 161-166.
70. Kaferle J, Strzoda CE. Evaluation of macrocytosis. *Am Fam Physician*, 2009. 79;3: 203-208.
71. Kerekes I, Yegles M, Grimm U, Wennig R. Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2009. 44;1: 62-66.
72. Kharbouche H, Faouzi M, Sanchez N, et al. Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *Int J Legal Med*, 2012. 126;2: 243-250.
73. Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, et al. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2009. 877;23: 2337-2343.

74. Kharbouche H, Steiner N, Morelato M, et al. Influence of ethanol dose and pigmentation on the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair. *Alcohol* (Fayetteville, NY), 2010. 44;6: 507-514.
75. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int*, 2010. 196;1-3: 2.
76. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int*, 2012. 218;1-3: 2.
77. Kintz P, Villain M, Vallet E, et al. Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Sci Int*, 2008. 176;1: 87-90.
78. Kulaga V, Gareri J, Fulga N, Koren G. Agreement between the fatty acid ethyl ester hair test for alcohol and social workers' reports. *Ther Drug Monit*, 2010. 32;3: 294-299.
79. Kulaga V, Pragst F, Fulga N, Koren G. Hair analysis of fatty acid ethyl esters in the detection of excessive drinking in the context of fetal alcohol spectrum disorders. *Ther Drug Monit*, 2009. 31;2: 261-266.
80. Kulaga V, Velazquez-Armenta Y, Aleksa K, Vergee Z, Koren G. The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE). *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 2009. 44;3: 287-292.
81. Lesch OM, Walter H, Antal J, et al. Alcohol dependence: is carbohydrate-deficient transferrin a marker for alcohol intake? *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 1996. 31;3: 257-264.
82. Liniger B, Nguyen A, Friedrich-Koch A, Yegles M. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic injury prevention*, 2010. 11;2: 123-126.
83. Littner Y, Bearer CF. Detection of alcohol consumption during pregnancy - current and future biomarkers. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007. 31;2: 261-269.
84. Madea B, Brinkmann B. *Handbuch gerichtliche Medizin*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York. 2003.
85. Marques P, Tippetts S, Allen J, et al. Estimating driver risk using alcohol biomarkers, interlock blood alcohol concentration tests and psychometric assessments: initial descriptives. *Addiction* (Abingdon, England), 2010. 105;2: 226-239.

86. Marques PR, Tippetts AS, Yegles M. Ethyl glucuronide in hair is a top predictor of impaired driving recidivism, alcohol dependence, and a key marker of the highest BAC interlock tests. *Traffic injury prevention*, 2014. 15;4: 361-369.
87. Martins Ferreira L, Binz T, Yegles M. The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci Int*, 2012. 218;1-3: 123-125.
88. McDonald H, Borinskya S, Kiryanov N, et al. Comparative performance of biomarkers of alcohol consumption in a population sample of working-aged men in Russia: the Izhevsk Family Study. *Addiction (Abingdon, England)*, 2013. 108;9: 1579-1589.
89. Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers IM, Trienekens P, van Oers JA. Comparing the diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean cell volume in a general practice population. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999. 23;6: 1052-1059.
90. Morini L, Politi L, Acito S, Groppi A, Poletini A. Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic Sci Int*, 2009. 188;1-3: 140-143.
91. Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Poletini A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*, 2006. 41;1: 34-42.
92. Morini L, Politi L, Poletini A. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction (Abingdon, England)*, 2009. 104;6: 915-920.
93. Morini L, Varango C, Filippi C, et al. Chronic excessive alcohol consumption diagnosis: comparison between traditional biomarkers and ethyl glucuronide in hair, a study on a real population. *Ther Drug Monit*, 2011. 33;5: 654-657.
94. Morini L, Zucchella A, Poletini A, Politi L, Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment. *Forensic Sci Int*, 2010. 198;1-3: 23-27.
95. Mundle G, Ackermann K, Munkes J, Steinle D, Mann K. Influence of age, alcohol consumption and abstinence on the sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase and mean corpuscular volume. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1999. 34;5: 760-766.
96. Oehme M. *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen*. Hüthig GmbH, Heidelberg. 1996.

97. Palmer RB. A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine. *Semin Diagn Pathol*, 2009. 26;1: 18-27.
98. Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction - Theory and Practice*. Wiley-VCH Inc., New York. 1997.
99. Peters F, Hartung M, Herbold M, et al. Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh), Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech*, 2009. 76; 185-208.
100. Pirro V, Valente V, Oliveri P, et al. Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers in a large population of clinically-classified subjects: pre-eminence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. 401;7: 2153-2164.
101. Politi L, Leone F, Morini L, Poletini A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem*, 2007. 368;1: 1-16.
102. Politi L, Morini L, Leone F, Poletini A. Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction (Abingdon, England)*, 2006. 101;10: 1408-1412.
103. Pragst F, Auwärter V, Sporkert F, Spiegel K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int*, 2001. 121;1-2: 76-88.
104. Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2006. 370;1-2: 17-49.
105. Pragst F. Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair. *Forensic Sci Int*, 2012. 217;1-3: 4-7.
106. Pragst F, Rothe M, Moench B, et al. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages. *Forensic Sci Int*, 2010. 196;1-3: 101-110.
107. Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic science international*, 2000. 107;1-3: 201-223.

108. Pragst F, Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther Drug Monit*, 2008. 30;2: 255-263.
109. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *The New England journal of medicine*, 2000. 342;17: 1266-1271.
110. Rehm J, Baliunas D, Borges GL, et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction (Abingdon, England)*, 2010. 105;5: 817-843.
111. Rosalki SB, Rau D, Lehmann D, Prentice M. Gamma-glutamyl transpeptidase in chronic alcoholism. *Lancet*, 1970. 2;7683: 1139.
112. Sachs H. Drogennachweis in Haaren. Kijewski, H (Hrsg). Proceedings of the Symposium „Das Haar als Spur – Spur der Haare“, 24. November 1993 in Göttingen, Verlag Schmidt-Römhild, Lübeck. 1997.
113. Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol (Fayetteville, NY)*, 1999. 19;3: 261-271.
114. Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol*, 1995. 19;2: 91-94.
115. Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci*, 1997. 42;6: 1099-1102.
116. Schubert W, Mattern R. Beurteilungskriterien - Urteilsbildung in der medizinisch-psychologischen Fahreignungsdiagnostik. 2nd Edition. Kirschbaum Verlag GmbH, Bonn. 2009.
117. Sillanaukee P. Laboratory markers of alcohol abuse. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1996. 31;6: 613-616.
118. Sillanaukee P, Massot N, Jousilahti P, et al. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population. *Am J Epidemiol*, 2000. 152;8: 747-751.
119. Smellie WS, Ryder SD. Biochemical "liver function tests". *BMJ (Clinical research ed)*, 2006. 333;7566: 481-483.

120. Sporkert F, Kharbouche H, Augsburg MP, Klemm C, Baumgartner MR. Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment. *Forensic Sci Int*, 2012. 218;1-3: 97-100.
121. Statistisches Bundesamt. Verkehrsunfälle Alkoholunfälle im Straßenverkehr 2010. 2011. 7. April 2012, https://http://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/UnfaelleAlkohol5462404107004.pdf?__blob=publicationFile.
122. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem*, 1991. 37;12: 2029-2037.
123. Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, et al. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int*, 2012. 218;1-3: 82-91.
124. Susse S, Selavka CM, Mieczkowski T, Pragst F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci Int*, 2010. 196;1-3: 111-117.
125. Thiesen H, Hesse M. Biological markers of problem drinking in homeless patients. *Addict Behav*, 2010. 35;3: 260-262.
126. Thomas L. Labor und Diagnose. Th-Books, Frankfurt am Main. 2005.
127. Ulsenheimer K. Drafting expert opinion reports in medical liability processes. *Der Anaesthetist*, 2011. 60;12: 1146-1151.
128. World Health Organization Regional Office for Europe. European Status Report on Alcohol and Health 2010. World Health Organization; Auflage: 1, 2010. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/128065/e94533.pdf.
129. Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, et al. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 2004. 39;1: 33-38.
130. Wurst FM, Dursteler-MacFarland KM, Auwärter V, et al. Assessment of alcohol use among methadone maintenance patients by direct ethanol metabolites and self-reports. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008. 32;9: 1552-1557.
131. Wurst FM, Kelso E, Weinmann W, et al. Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than

- found with the AUDIT - a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2008. 198;4: 401-405.
132. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide - a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1999. 34;1: 71-77.
 133. Wurst FM, Seidl S, Alt A, Metzger J. Direct ethanol metabolite ethyl glucuronide. Its value as alcohol intake and recurrence marker, methods of detection and prospects. *Psychiatr Prax*, 2000. 27;8: 367-371.
 134. Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, et al. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci Int*, 2004. 145;2-3: 167-173.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mara Büchner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Alkoholkonsummarker im Haar von Abstinenzlern, Normaltrinkern und Patienten mit chronischem Alkoholabusus im Vergleich mit traditionellen Biomarkern im Blut“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8.2 Anteilserklärung an den Publikationen

Mara Büchner hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Hastedt M, Büchner M, Rothe M, Gapert R, Herre S, Krumbiegel F, Tsokos M, Kienast T, Heinz A, Hartwig S. Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair. Forensic Sci Med Pathol. 2013 Dec;9(4): 471-7.

Die Doktorandin Mara Büchner rekrutierte die Studienteilnehmer und Studienteilnehmerinnen, führte die Studie praktisch durch, erfasste die erhobenen Daten und wertete diese gemeinsam mit dem Autorenkollektiv aus.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8.3 Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.4 Publikationsliste

1. Hastedt M, Büchner M, Rothe M, Gapert R, Herre S, Krumbiegel F, Tsokos M, Kienast T, Heinz A, Hartwig S. Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair. *Forensic Sci Med Pathol*. 2013 Dec;9(4): 471-7.

9 Danksagung

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Weg stets mit Rat und Tat sowie mit liebevoller Zuwendung unterstützt hat. Ohne ihre Geduld und Aufmunterung wäre diese Arbeit heute sicher nicht das, was sie ist, und ich wäre nicht die, die ich bin. Ihr habt mir den Mut und die Kraft gegeben, meinen Weg zu gehen, um mein Ziel zu erreichen. Danke. Ich bin froh, euch als Familie zu haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Betreuer Dr. Sven Hartwig sowie Dr. Martin Hastedt verpflichtet. Sie haben mir das Know-how mitgegeben, mich im Labor zurechtzufinden, um diese Dissertation erstellen zu können. Gleichzeitig danke ich dem gesamten Laborpersonal für ihre Erklärfreudigkeit und ihre Geduld, die sie mir entgegengebracht haben.

Zu weiterem Dank bin ich den Krankenhäusern verpflichtet, die es mir ermöglicht haben, dort meine Daten zu erheben.

Ein großes Dankeschön geht an alle Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt und an dieser Studie teilgenommen haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zu Stande gekommen. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang der Familie Becks, die komplett zu meinem Spenden-Event erschienen ist und deren Sohn Benedikt ich diese Abhandlung widme.

Weiterhin liegt es mir am Herzen, mich bei meinen Kommilitonen und Freunden zu bedanken, mit denen ich mich während der Erstellung dieser Arbeit immer wieder austauschen konnte. Danke für eine schöne Studienzeit mit euch.