

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik  
Institut für Rechtsmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Püschel

## Spektrophotometrische Untersuchungen der Absorbance von Hämoglobin-Derivaten im zeitlichen Verlauf in Leichenflecken

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Berit Staak Ridder  
aus Emden

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.02.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Püschel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker**

### **III Inhaltsverzeichnis**

III	Inhaltsverzeichnis.....	III
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	V
V	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	VI
	V.I Abbildungen.....	VI
	V.II Tabellen.....	VIII
1	Fragestellung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Leichenflecken.....	2
2.2	Gängige Methoden der Todeszeitbestimmung.....	4
2.3	Hämoglobin.....	6
2.4	Kohlenmonoxid und Carboxyhämoglobin.....	7
2.5	Spektroskopie und Spektrophotometrie.....	11
2.5.1	Reflexionsspektroskopie.....	12
2.5.2	Derivativspektroskopie.....	13
2.5.3	NIR-Spektroskopie.....	16
2.6	Optische Eigenschaften von Hämoglobin.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Verstorbene.....	18
3.2	Spektrometer.....	18
3.3	Software.....	20
3.4	Messverfahren.....	22
3.5	Datenauswertung.....	25
3.5.1	Statistische Auswertung.....	28
3.6	Ethikvotum.....	28
4	Ergebnisse.....	29

4.1	Untersuchung der Hämoglobinderivate .....	29
4.1.1	Lokalisation der Minima und Maxima im zeitlichen Verlauf .....	32
4.1.2	Die Hämoglobinderivate im zeitlichen Verlauf .....	35
4.1.3	Verhalten der Leichenfleckfarbe und der dazugehörigen Spektren..... nach 48h und 72h post mortem.....	43
4.2	Kohlenmonoxid-Messreihe .....	47
4.2.1	Lage der Extrema der Kohlenmonoxidmessreihe .....	48
4.2.2	Intensität der Spektren und Konzentration im Blut .....	50
4.2.3	Vergleich mit nicht-bestätigtem Fall CO-002 .....	50
4.3	Vergleich von Kohlenmonoxidintoxikation und Reoxygenierung .....	52
5	Diskussion.....	54
5.1	Diskussion der Methodik .....	54
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	55
5.3	Limitationen.....	61
5.4	Ausblick.....	62
6	Zusammenfassung.....	64
6.1	Deutsch .....	64
6.2	English .....	65
VI	Anhang .....	IX
VI.I	Tabellen .....	IX
VI.II	Dokumentationsbogen .....	XIV
VII	Literaturverzeichnis .....	XV
VIII	Danksagung.....	XXV
IX	Lebenslauf .....	XXVII
X	Eidesstattliche Versicherung.....	XXVII

## **IV Abkürzungsverzeichnis**

A	Absorbance
C	Kohlenstoff
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
COHb	Carboxyhämoglobin
d2A	zweite Ableitung der Absorbance
HbO <sub>2</sub>	oxygeniertes Hämoglobin
KHK	koronare Herzkrankheit
m1	Minimum m1
m2	Minimum m2
m2 <sub>co</sub>	CO-Minimum m2 <sub>co</sub>
m3	Minimum m3
m3 <sub>co</sub>	CO-Minimum m3 <sub>co</sub>
m4	Minimum m4
m4 <sub>co</sub>	CO-Minimum m4 <sub>co</sub>
M2	Maximum M2
M2 <sub>co</sub>	CO-Maximum M2 <sub>co</sub>
M3	Maximum M3
M3 <sub>co</sub>	CO-Maximum M3 <sub>co</sub>
M4	Maximum M4
M4 <sub>co</sub>	CO-Maximum M4 <sub>co</sub>
M5	Maximum M5
M5 <sub>co</sub>	CO-Maximum M5 <sub>co</sub>
MetHb	Methämoglobin
NIR	Nahinfrarot
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
RHb	reduziertes Hämoglobin
VHF	Vorhofflimmern
VIS	sichtbar („visible“)

## **V Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

### **V.I Abbildungen**

Abbildung 1: Ausgeprägte Livores mit Vibices im rechten Brustbereich eines 46-jährigen männlichen Verstorbenen .....	2
Abbildung 2: Hellrote Leichenflecken bei tödlicher CO-Intoxikation (COHb-Gehalt im Blut: 70%). 30-jähriger, männlicher Verstorbener, Suizid mit Holzkohlegrill .....	4
Abbildung 3: Bereiche elektromagnetischer Strahlung und zugehörige Wellenlängen (Zeeck 2017).....	12
Abbildung 4: Summenspektrum aus zwei gleichartigen Gaußkurven, erste bis vierte Ableitung (Schmidt 2000).....	14
Abbildung 5: Normalspektrum und dessen 2. Ableitung eines angesäuerten, verdünnten Kontroll-Urins (Schmitt 1977).....	15
Abbildung 6: Linearität der Porphyrinbestimmung durch Derivativspektroskopie. Ergebnisse mit Verdünnungsreihen von zwei Urinen mit erhöhter Porphyrinkonzentration (Schmitt 1977) .....	16
Abbildung 7: Strahlengang im Spektrometer, schematisch (aus dem Konstruktionsblatt der Firma DERMALOG) .....	19
Abbildung 8: Referenzspektren der unterschiedlichen humanen Hämoglobinderivate, Simulation mithilfe bekannter Extinktionskoeffizienten.....	21
Abbildung 9: Referenzspektren der unterschiedlichen Hämoglobinderivate in zweiter Ableitung, Simulation mithilfe bekannter Extinktionskoeffizienten .....	21
Abbildung 10: Markierungen für die Messung im Bereich eines Leichenfleckes über dem rechten M. deltoideus; 46-jähriger, männlicher Verstorbener .....	24
Abbildung 11: Durchführung der Messung mit dem Spektrometer der Firma DERMALOG .....	25
Abbildung 12: Beispielhaft das Spektrum von Fall 007, 17,5h-Messung, 2. Ableitung, mit Beschriftung der Extrema.....	26
Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung der 2. Ableitung des Absorptionsspektrums von CO-Fall 001 mit Beschriftung der Extrema .....	27

Abbildung 14: Alter der Verstorbenen [Jahre], Hb-Derivate-Messreihe .....	30
Abbildung 15: Todesursachen der Verstorbenen nach ICD-10 der WHO .....	31
Abbildung 16: Maxima M2 (a), M3 (b), M4 (c), M5 (d), Boxplots der Lokalisationen im zeitlichen Verlauf.....	32
Abbildung 17: Minima m1 (a), m2 (b), m3 (c), m4 (d), Boxplots der Lokalisationen im zeitlichen Verlauf .....	33
Abbildung 18: Darstellung aller Spektren gleicher Messzeitpunkte .....	34
Abbildung 19: Änderung des RHbs im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h- Messung.....	36
Abbildung 20: Änderung des RHbs im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 11,5h- Messung.....	37
Abbildung 21: Änderung des HbO <sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 5,5h-Messungen, logarithmische Darstellung.....	38
Abbildung 22: Änderung des HbO <sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 11,5h-Messungen, logarithmische Darstellung.....	39
Abbildung 23: Änderung des MetHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h- Messung, logarithmische Darstellung.....	40
Abbildung 24: Änderung des MetHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 11,5h- Messung, logarithmische Darstellung.....	41
Abbildung 25: Änderung des COHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h- Messungen, logarithmische Darstellung.....	42
Abbildung 26: Änderung des COHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 11,5h-Messungen, logarithmische Darstellung.....	43
Abbildung 27: Übersicht aller Spektren von Fall 014 .....	44
Abbildung 28: Übersicht aller Spektren mit Linksverschiebung .....	47
Abbildung 29: COHb-Gehalt im Blut [%] der Verstorbenen, Kohlenmonoxid- Messreihe.....	48
Abbildung 30: Übersicht aller Fälle mit CO-Vergiftung, zweite Ableitung der Absorbance .....	49
Abbildung 31: Peakdifferenz $\Delta A$ und CoHb-Gehalt [%] im Blut der Verstorbenen....	50
Abbildung 32: Spektren der CO-Messreihe .....	51
Abbildung 33: Referenzspektren von COHb (blau) und HbO <sub>2</sub> (grün).....	52
Abbildung 34: Vergleich der Spektren mit Kältereoxygenierung (schwarz) und derjenigen von Verstorbenen mit CO-Intoxikation (rot).....	53

## V.II Tabellen

Tabelle 1: Zahl der Messungen zu den jeweiligen Messzeitpunkten [h] .....	31
Tabelle 2: Anzahl der Messungen in Bezug auf Farbe, Zeitpunkt und Vorhandensein einer spektrophotometrischen Linksverschiebung .....	45
Tabelle 3: Lage der Extrema bei Fällen mit Linksverschiebung [nm] und Referenzwerte des HbO <sub>2</sub> -Referenzspektrums .....	46
Tabelle 4: Lokalisation [nm] der Extrema bei den Spektren der CO-Fälle mit Referenzwerten .....	49
Tabelle 5: Fälle der Hämoglobinderivat-Messreihe .....	IX
Tabelle 6: Fälle der Kohlenmonoxid-Messreihe.....	X
Tabelle 7: Anteile der einzelnen Hämoglobinderivate pro Fall und post mortalem Zeitpunkt [%].....	X



# 1 Fragestellung

Bislang ist es nicht möglich, den Todeszeitpunkt eines aufgefundenen Verstorbenen exakt zu bestimmen. Es gibt aktuell mehrere Methoden, um einen Näherungswert zu erhalten (Temperaturmessmethode, Wegdrückbarkeit von Leichenflecken, Ausprägung der Leichenstarre etc.). Ein weiteres Problem stellt das Vorhandensein von hellroten Leichenflecken dar. Diese können verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel Kälte oder aber eine Kohlenmonoxidvergiftung. Für die Helfer am Fundort der Leiche kann die Unterscheidung dabei weitreichende Konsequenzen haben, da Kohlenmonoxid sehr giftig, aber farb- und geruchlos ist. Aktuell gibt es keine Möglichkeit einer nicht-invasiven Schnelldiagnostik bei aufgefundenen Verstorbenen mit hellroten Leichenflecken und Verdacht auf Kohlenmonoxidintoxikation. Durch die Firma DERMALOG wurde ein Gerät entwickelt, welches mithilfe von VIS- und NIR-Spektroskopie in Reflexion die Extinktionsspektren von Leichenflecken misst. Es erfolgten zwei unterschiedliche Messreihen mit unterschiedlichen Fragestellungen. Ziel dieser Arbeit soll sein, die Änderung der einzelnen Hämoglobinderivate im zeitlichen Verlauf zu messen und Regelmäßigkeiten in den Verläufen zu registrieren, um die erhobenen Daten in naher Zukunft zur Bestimmung der Todeszeit verwenden zu können. Weiterhin wird untersucht, ob mithilfe des Reflexionsspektrometers bei Vorliegen hellroter Leichenflecken eine Kohlenmonoxidvergiftung sicher aufgedeckt werden kann.

## Spezifische Fragestellungen:

- 1.) Ist es möglich, mithilfe des Reflexionspektrometers zu messen, ob und wie sich die Anteile der Hämoglobin-Derivate in Leichenflecken im zeitlichen Verlauf ändern?
- 2.) Lassen sich daraus Rückschlüsse auf den Todeszeitpunkt ziehen?
- 3.) Ist es möglich, mithilfe des Reflexionspektrometers zu unterscheiden, ob hellrote Leichenflecken durch Kälteexposition oder durch eine Kohlenmonoxidvergiftung entstanden sind?
- 4.) Können mithilfe des Geräts Rückschlüsse auf die Carboxyhämoglobin-Konzentration im Blut eines Verstorbenen gezogen werden?

## 2      **Einleitung**

### **2.1 Leichenflecken**

Das Auftreten von Leichenflecken, lateinisch *Livor mortis*, ist das früheste sichere Todeszeichen (Madea 2003). Durch den eingetretenen Herz- und Kreislaufstillstand kommt es bereits nach 20 bis 30 Minuten zur sogenannten Hypostase: das Blut sackt in abhängig liegende Körperbereiche und sammelt sich in den dort vorhandenen Kapillaren. Je mehr Blut der Leichnam enthält und je dünnflüssiger dieses ist, desto frühzeitiger und intensiver erscheinen die Verfärbungen (Hofmann und Haberda 1927) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: ausgeprägte Livores mit Vibices im rechten Brustbereich eines 46-jährigen männlichen Verstorbenen**

Innerhalb stark ausgeprägter Leichenflecken kann es zum Auftreten von so genannten *Vibices* kommen. Hierbei handelt es sich um punkt- oder reiskornförmige intradermale Einblutungen durch Berstung der Blutgefäße (Mittmeyer 1971). Die Livores erscheinen am Anfang fleckförmig als sogenannte Roseolen und konfluieren schließlich zu großflächigen Arealen (Madea 2003). Lediglich an den Aufliegeflächen, an Hautfalten oder in Bereichen enganliegender Kleidungsstücke, sowie dort, wo der tote Körper auf Gegenständen gelegen hat, sind Aussparungen sichtbar (Hofmann und Haberda

1927). Mit fortschreitendem postmortalem Intervall kommt es zum einen zur Hämokonzentration, also zum Austritt von Blutplasma aus den Gefäßen durch erhöhten hydrostatischen Druck und erhöhte Gefäßpermeabilität. Zum anderen kommt es zu einem späteren Zeitpunkt zur Hämolyse, also der Zerstörung der Erythrozyten, und somit bei gleichzeitiger Autolyse der Gefäßwände zu einer Hämoglobindiffusion aus den Blutgefäßen heraus in das umliegende Gewebe. Diese Faktoren führen dazu, dass die zu Beginn noch wegdrückbaren und umlagerbaren Leichenflecken diese Eigenschaften verlieren (Henssge und Madea 1988).

Anfangs noch hellrot, nehmen die Leichenflecken sehr bald eine blau-livide Färbung an, was durch den Verbrauch des im Blut noch vorhandenen Sauerstoffs erklärt wird (Madea 2003). Liegt der Leichnam in einer kalten Umgebung mit einer Temperatur von 10-15 °C oder darunter (Kessler 1951) und erreicht die Hauttemperatur etwa  $10,3 \pm 2,7^\circ\text{C}$  (Bohnert et al. 2008) oder niedriger, kommt es zur so genannten *Kältereoxygenierung* (Tsokos 2005b). Hierbei diffundiert Sauerstoff durch die feuchte Haut des Leichnams in die sich in der Dermis befindlichen Blutanteile (Watchman et al. 2011). Durch die geringe Umgebungstemperatur verschiebt sich die Sauerstoffbindungskurve nach links, was die Bindung der O<sub>2</sub>-Moleküle an das Hämoglobin erleichtert (Schmidt und Thews 1982). Das Hämoglobin wird reoxygeniert und das Blut erlangt eine hellrote Farbe, sodass die Livores ebenfalls hellrot erscheinen. Typisch für durch Kälte nachträglich hervorgerufene Verfärbungen sind blau-livide und hellrote Anteile innerhalb eines Leichenflecks (Madea 2003).

Im Falle einer Vergiftung mit Kohlenmonoxid behalten die Leichenflecken ihre hellrote, in der Literatur als „kirschrot“ (Payne-James und Robinson 2005) beschriebene Farbe (Abbildung 2). Hellrote Leichenflecken treten ebenfalls bei Cyanidvergiftungen (Laves 1929) durch Blockierung der Cytochromoxidase der Atmungskette und Hemmung der Sauerstoffdissoziation vom Hämoglobin und außerdem bei tödlicher Hypothermie auf (Tsokos 2005b). Bei Vergiftung mit Cyanid finden sich während der Obduktion düsterrote Organe, während im Falle einer Kohlenmonoxidvergiftung die inneren Organe ebenfalls hellrot imponieren (Schütz und Machbert 1988). Bräunliche oder braungräuliche Leichenflecken finden sich bei Nitrat- und Nitritvergiftungen und beruhen auf einer Bildung von Methämoglobin (Hofmann und Haberda 1927). Grünliche Leichenflecken präsentieren sich durch die Entstehung von Sulfhämoglobin bei Fäulnisprozessen (Tsokos 2005b). Bei starken Blutverlusten oder einer relevanten

Anämie vor dem Tod kann die Ausprägung von Leichenflecken nur sehr spärlich ausfallen oder auch komplett fehlen. In letzterem Fall ist ein Blutverlust von mindestens 65% des Gesamtblutvolumens (bei Erwachsenen) notwendig (Tsokos 2005a).



**Abbildung 2: Hellrote Leichenflecken bei tödlicher CO-Intoxikation (COHb-Gehalt im Blut: 70%).  
30-jähriger, männlicher Verstorbener, Suizid mit Holzkohlegrill**

## **2.2 Gängige Methoden der Todeszeitbestimmung**

Nicht immer lässt sich sagen, wann genau der Tod eingetreten ist. Liegen keine eindeutigen Hinweise (Tod vor Zeugen, Tod unter ärztlicher Überwachung oder Reanimation) vor, kann mithilfe verschiedener Befunde am Leichnam eine Todeszeitschätzung vorgenommen werden.

Im klinischen Alltag werden zur Abschätzung des Todeszeitpunktes die Ausprägungsgrade der „klassischen Todeszeichen“ (Leichenflecken, Leichenstarre) und gegebenenfalls supravitale Reaktionen wie das Zsako'sche Phänomen und die Ausprägung eines idiomuskulären Wulstes (leicht durchführbare Tests zur supravitalen mechanischen Erregung der Skelettmuskulatur) herangezogen. Bezüglich der Leichenflecken liegt das Augenmerk des Untersuchers auf Ausprägung,

Wegdrückbarkeit und Umlagerbarkeit. Die Totenstarre wird in mehreren großen und kleinen Gelenken getestet und lässt sich nach Ausprägungsgrad (keine, minimale, mäßige, kräftige oder extrem starke Starre), beziehungsweise im zeitlichen Verlauf nach verschiedenen Kriterien (Eintritt, Wiederbilden nach Brechen, volle Ausprägung, Dauer oder Lösung) bewerten. Für alle frühen Leichenerscheinungen und deren Ausprägungen gibt es in der Fachliteratur Angaben, welche die Durchschnitts- und Streuungswerte der zeitlichen Beziehung zum Todeszeitpunkt (basierend auf rechtsmedizinisch-forensischen Studien) in Stunden beinhalten. Die Kombination der verschiedenen Parameter ermöglicht eine Eingrenzung der Todeszeit auf wenige Stunden. Problematisch an all diesen Methoden ist die Subjektivität der Einschätzung, beziehungsweise die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher und dessen Durchführung der Tests (Henssge und Madea 1988, Krause 2003).

Weitere Methoden zur Schätzung des Todeszeitpunktes und Liegezeitdauer eines Leichnams erfordern rechtsmedizinisch-fachärztliches Wissen und spezielles Equipment. Hier seien als gängige Verfahren die elektrische Erregbarkeit der mimischen Muskulatur (M. orbicularis oculi und M. orbicularis oris) und die pharmakologische Reizung der Pupillenmuskulatur z.B. mit Acetylcholin oder Adrenalin/Noradrenalin genannt. Standardmethode (bei Fehlen von Kontraindikationen) rechtsmedizinischer Todeszeitbestimmungen ist aktuell die Rektaltemperatur-Todeszeit-Nomogramm-Methode. Hierbei handelt es sich um eine Kombinationsmethode aus Rektaltemperatur, mittlerer Umgebungstemperatur, Körpergewicht und Korrekturfaktor, welche in ein Nomogramm eingetragen und abgelesen werden (Henssge et al. 1985, Henssge und Madea 2003). Weiterhin wird bei Leichen die Ausprägung von späten Leichenerscheinungen herangezogen, um eine grobe Todeszeitschätzung vorzunehmen. Hierbei handelt es sich um fortschreitende Fäulnis bis hin zu Verwesung, Mumifizierung, Fettwachsbildung, sowie die Leichenentomologie. Auch hierbei spielt die Umgebung (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Umweltfaktoren) eine große Rolle und beeinflusst die Leichenerscheinungen maßgebend; sie muss daher in die Überlegungen mit einbezogen werden (Krause 2003, Henssge und Madea 2003).

## 2.3 Hämoglobin

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin ist ein sich in den Erythrozyten befindendes Chromoprotein. Es transportiert den eingeatmeten Sauerstoff aus der Lunge in die Peripherie und zu den Organen und einen Teil des anfallenden Kohlendioxids zur Lunge zurück. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Säure-Base-Haushalts (Boron und Boulpaep 2005). Hämoglobin besteht aus einer Eiweißkomponente, dem Globin, welches aus vier Polypeptidketten (je zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten) und je einem Häm-Molekül in der Mitte aufgebaut ist. Dieses Häm-Molekül entspricht der Farbstoffkomponente des Hämoglobins und besteht aus einem Protoporphyringerüst mit zentralem zweiwertigem Eisenatom. Die Sauerstoffbindung findet an diesem Eisenatom statt, sodass jedes Hämoglobinkomplexmolekül vier Sauerstoffmoleküle binden kann (Berg et al. 2018).

Hämoglobin kommt in verschiedenen Formen im menschlichen Körper vor, diese Formen werden *Hämoglobinderivate* genannt und können ineinander übergehen. Bei gesunden Menschen finden sich hauptsächlich zwei Hämoglobinderivate: eine Form mit gebundenem Sauerstoffmolekül (Oxyhämoglobin, HbO<sub>2</sub>) und eine reduzierte Form ohne Sauerstoffmolekül (Desoxyhämoglobin, RHb) (Bremmer et al. 2011). Methämoglobin (MetHb) und Carboxyhämoglobin (COHb) zählen zusammen mit Sulfhämoglobin (SulfHb) zu den Dyshämoglobinen, welche nicht zur reversiblen O<sub>2</sub>-Bindung fähig sind (Arndt und Gresner 2013). Bei Methämoglobin (MetHb) handelt es sich um eine Form des Hämoglobins, welche physiologischerweise in sehr geringen Konzentrationen im menschlichen Körper vorkommt und bei welcher das zweiwertige Eisen (Fe<sup>2+</sup>) zu einem dreiwertigen Eisen (Fe<sup>3+</sup>) oxidiert wurde. Methämoglobin ist eine inaktive Form des Hämoglobins, das heißt, es kann keinen Sauerstoff mehr aufnehmen und erschwert die Abgabe von bereits gebundenem Sauerstoff an das Gewebe (Schwerd 1961b). Bei Gesunden wird etwa 0,5-2% des Hämoglobins mittels Autooxidation spontan zu Methämoglobin oxidiert, sodass bis zu 2% MetHb im Blut physiologisch sind (Buddecke und Fischer 1992). Die Reduktion zu RHb wiederum erfolgt durch das Reduktaseprotein NADH-Cytochrom-b5 (Bremmer et al. 2011). Bei Vergiftungen durch Oxidationsmittel wie Nitriten oder Nitraten, aber auch medikamenteninduziert (u.a. nach Gabe von Lidocain, Sulfonamiden, Nitroglyzerin, Metoclopramid oder Primaquin), sowie bei familiären Methämoglobinämien kann es zu erhöhten Methämoglobinkonzentrationen im Blut kommen, was zu klinischen Zeichen von Hypoxie sowie einer schokoladenbraunen Färbung des Blutes führt. Säuglinge

sind hierbei vulnerabler als Erwachsene, da zum einen die NADH-abhängige Reduktase in den ersten Lebensmonaten eine verminderte Enzymaktivität aufweist, und zum anderen das nach der Geburt noch vorhandene fetale Hämoglobin oxidationsanfälliger ist. Somit reichen bereits kleinere Mengen von Oxidationsmitteln z.B. Nitrit im Trinkwasser, um eine lebensgefährliche Methämoglobinämie zu verursachen (Kochs et al. 2009). Zu einer Zyanose der Schleimhäute kommt es bereits bei Methämoglobinkonzentrationen von 15% des Gesamthämoglobins, Lethargie und Schwäche treten ab 30% auf. Blutkonzentrationen von 60-80% werden als sicher tödlich angesehen (Lüllmann et al. 2006, Hayes 2008).

Carboxyhämoglobin (COHb) entsteht bei Kontakt des Hämoglobins mit Kohlenstoffmonoxid (CO) in der Atemluft (Kapitel 2.4) und verhindert ebenfalls eine Aufnahme von Sauerstoffmolekülen, da die entsprechenden Bindungsstellen bereits durch CO-Moleküle besetzt sind, und diese eine weit größere Affinität zum Hb besitzen. Auch hier verliert das Hämoglobin seine Funktion als Sauerstofflieferant, was bei hohen Konzentrationen von COHb zu Tod durch Asphyxie führt (Payne-James und Robinson 2005). In dieser Arbeit wurden Leichenflecken auf die Hämoglobinderivate RHb, HbO<sub>2</sub>, MetHb und COHb untersucht.

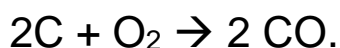
## **2.4 Kohlenmonoxid und Carboxyhämoglobin**

Kohlenmonoxid (CO) ist ein farb- und geruchloses, nicht-reizendes, aber hochgiftiges Gas, welches bei der unvollständigen Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Stoffen entsteht. Dies geschieht beispielsweise, wenn ein Übermaß an Kohlenstoff oder zu wenig Sauerstoff vorhanden ist.

Bei einem normalen Verbrennungsvorgang lautet die exotherme Gleichung:



Die zugehörige Gleichung, bezogen auf einen unvollständigen Verbrennungsvorgang lautet:



Normale Atemluft enthält weniger als 0,001% Kohlenmonoxid, wobei in städtischen Gebieten die Konzentration generell höher ist als in ländlichen Gebieten. Nichtraucher haben einen physiologischen COHb-Wert im Blut von etwa 0,5%; dieser kann

durchaus auf 1-3% ansteigen, wenn zusätzlich durch hämolytische Reaktionen oder Denaturierung von Häm-haltigen Enzymen Kohlenmonoxid endogen im Körper produziert wird (Payne-James und Robinson 2005).

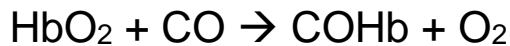
Bei Rauchern finden sich durchschnittlich CO-Werte im Blut von 3% bis 12% (Schütz und Machbert 1988). Pro Jahr erfolgen in der Bundesrepublik Deutschland etwa 3700 Klinikeinweisungen aufgrund von Kohlenmonoxidintoxikationen, etwa 370 Personen jährlich versterben an einer Vergiftung. Somit zählt Kohlenmonoxidintoxikation zu den häufigsten akzidentiellen Vergiftungsarten in Deutschland (Rappard et al. 2014). Häufige Quellen relevanter Mengen Kohlenmonoxids sind beispielsweise Holzöfen, Holzkohlegrills, Autoabgase, Kohle-, Gas- oder Ölheizungen, undichte Schornsteine und Zigarettenrauch. Besonders gefährliche Konzentrationen von CO in der Atemluft entstehen bei unzureichender Frischluftzufuhr in abgeschlossenen Räumen (Payne-James und Robinson 2005). Auch Holzpellets, welche zur Beheizung von Wohnräumen verwendet werden, können eine Quelle von Kohlenmonoxid darstellen. Hierbei wird das CO vom Harz frisch hergestellter Pellets abgesondert, was bei der Lagerung zu lebensgefährlichen Kohlenmonoxidkonzentrationen der Atemluft führen kann (Cortis et al. 2015). Eine weitere relevante Quelle von gesundheitsgefährdenden Mengen Kohlenmonoxids stellen Wasserpfeifen, sog. *Shishas* oder *Hookas*, dar, welche sich gerade unter Jugendlichen großer Beliebtheit erfreuen. Durch das Inhalieren von Wasserpfeifenrauch erfolgt die Aufnahme einer bis zu 10-fach höheren Menge von Kohlenmonoxid als bei Zigarettenrauch, weshalb das Risiko einer Intoxikation hier erhöht ist. Man geht davon aus, dass die Dunkelziffer von Kohlenmonoxidvergiftungen nach Konsum von Shisha-Rauch erheblich höher ist, als die tatsächlich diagnostizierten Fälle (Rappard et al. 2014).

Aufgrund der Eigenschaften des Gases ist es oft schwierig, eine Kohlenmonoxidexposition aufzudecken und Intoxikationen werden häufig fehlgedeutet (Payne-James und Robinson 2005). Deniz et al maßen bei 1788 Patienten, welche sich mit unspezifischen Symptomen (Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Palpitationen) in der Notaufnahme in der Kirikkale University School of Medicine (Kanada) vorstellten, bei der Aufnahme zusätzlich per Puls-CO-Oximetrie den COHb-Gehalt im Blut. Bei 106 Personen konnte hierdurch eine Kohlenmonoxidvergiftung diagnostiziert werden (5,9%), welche ohne das Screening übersehen worden wäre (Deniz et al. 2017).



Kohlenstoffmonoxid wird eingeatmet und diffundiert über die Alveolen in die Blutbahn. Dort dringt es in die Erythrozyten ein und bindet mit einer 200 bis 300-fach höheren Affinität als Sauerstoff (O<sub>2</sub>) an das Hämoglobin; es kommt zu einer starken Verdrängung der Sauerstoffmoleküle von ihrer Bindungsstelle am Häm-Molekül. Dies führt zur Entstehung von Carboxyhämoglobin (COHb).

Die zugehörige Reaktionsgleichung lautet wie folgt:



(Payne-James und Robinson 2005).

Dadurch, dass Kohlenmonoxid zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die O<sub>2</sub>-Abgabe von vorhandenem HbO<sub>2</sub> hat, resultiert eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, was zu einer schlechteren Sauerstoffversorgung der Gewebe führt (Schütz und Machbert 1988). Eine Atemluftkonzentration von 0,1% Kohlenmonoxid reicht aus, um eine 50-prozentige Sättigung des Blutes mit CO zu verursachen (Schwerd 1961b). Zelluläre Hypoxie ist die Folge. Da viele verschiedene Symptome bei Kohlenmonoxidvergiftungen bekannt und beschrieben sind, lässt sich von einer „Erkrankung mit tausend Gesichtern“ sprechen. Bei einer akuten Kohlenmonoxidvergiftung kommt es durch langsame Aufsättigung des Hämoglobins zu klinischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Erbrechen, Schwindel, Sehstörungen, Palpitationen, Ohrensausen, Muskelschwäche, Herzinsuffizienz, Atemnot und Bewusstlosigkeit, bis hin zum Tod durch Asphyxie. Die oft als typisch beschriebene Trias von kirschroten Lippen, Zyanose und retinalen Blutungen wird hingegen nur selten beobachtet (Payne-James und Robinson 2005). COHb-Werte des Blutes von über 55% sind als lebensbedrohlich anzusehen (Schwerd 1961b). Bei Kleinkindern, älteren Menschen und Personen mit kardialen Vorerkrankungen oder Anämie können auch schon niedrigere Werte tödlich sein (Schütz und Machbert 1988). Bei chronischen Vergiftungen verläuft die klinische Symptomatik weniger akut und eher schleichend. Es kommt über Wochen zu unspezifischen Symptomen wie allgemeiner Abgeschlagenheit, Schwindel, Kopfschmerzen, Leistungsknick, Appetitverlust, Gedächtnisschwäche, Reizbarkeit und Schlaflosigkeit. Hinzu kommt, dass die COHb-Werte sich rasch normalisieren können, wenn der Patient seine gewohnte CO-belastete Umgebung verlässt. Die Diagnose und der Nachweis einer chronischen CO-

Intoxikation sind daher noch einmal deutlich schwieriger als bei einer akuten Vergiftung (Schwerd 1961b, Schütz und Machbert 1988).

Da Kohlenmonoxid nach dem Tod über die Haut bis zu 1 cm tief in die Haut eindringen kann, ist das Blut peripherer Gefäße nicht aussagekräftig für eine exakte Bestimmung des COHb-Gehalts im Leichenblut. Deshalb ist es notwendig, zentrales Blut zu verwenden (Schwerd 1961b). Standardmäßig wird dem Leichnam dazu Herzblut entnommen und anschließend toxikologisch untersucht.

Es gibt mehrere gängige in-vitro-Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Carboxyhämoglobin und CO im Blut. Im klinischen Alltag findet meist die spektrophotometrische Zweiwellenlängenmethode Anwendung. Es gilt die Annahme, dass die Ratio zweier Extinktionen, welche mit derselben Konzentration und derselben Schichtdicke gemessen werden, an verschiedenen Wellenlängen gleich ist. So können die Konzentrationen verschiedener Hämoglobinderivate in einer Blutprobe ermittelt werden, indem sich die individuellen Absorptionseigenschaften zunutze gemacht werden. Bezogen auf COHb wird eine Blutprobe hämolysiert, verdünnt und mittels Spektrometer die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängenpaaren gemessen. Es wird die Ratio der Extinktionsquotienten berechnet und der prozentuale COHb-Gehalt mit Hilfe einer Eichkurve oder Tabelle ermittelt. Gängige Wellenlängenpaare stellen zum Beispiel die von Hüfner (E541/E560) und Heilmeyer (E576/E560) empfohlenen Werte dar, zudem kann eine Reduktion der Blutlösung für die qualitative Sicherung bei 555/538 nm und 555/568 nm erfolgen (Schwerd 1961b, Schütz und Machbert 1988).

Einen wichtigen Aspekt stellt die schnelle Detektion von Kohlenmonoxid in der Umgebungsluft am Einsatzort von Feuerwehr und Notärzten dar. Zur Minimalausrüstung der Feuerwehr zählen Prüfröhrchen für Kohlenmonoxid, mit welchen relevante Mengen von CO in der Umgebungsluft detektiert werden können (Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe 2013). Für Patienten mit CO-Intoxikation gibt es Puls-CO-Oximeter (beispielsweise das RAD-57 Puls-CO-Oximeter) mit denen bereits am Einsatzort eine Kohlenmonoxidintoxikation detektiert und gemonitored werden kann (Sebbane et al. 2013). Voraussetzung ist jedoch das Vorhandensein eines Pulses. Weiter existieren tragbare Oximeter (zum Beispiel das AVOXimeter® 4000) zur optischen Blutanalyse am Patientenbett oder am Einsatz-

beziehungsweise am Leichenfundort. Hierfür wird eine Blutentnahme benötigt (Fujihara et al. 2013). Aktuell gibt es keine Möglichkeit einer nicht-invasiven Schnelldiagnostik bei aufgefundenen Verstorbenen mit Verdacht auf Kohlenmonoxidintoxikation. Dies spielt insbesondere eine Rolle in Auffindsituationen, in denen eine Person aufgrund einer vorübergehenden Abflusshemmung von sich ansammelndem Kohlenmonoxids in geschlossenen Räumen an Kohlenmonoxidvergiftung verstorben ist, zum Zeitpunkt des Auffindens jedoch kein erhöhter CO-Gehalt in der Raumluft mehr detektierbar ist (Püschel et al. 2008). In diesem Fall kann eine erneute Verlegung des Abzugs für die anwesenden Personen lebensgefährlich werden.

## **2.5 Spektroskopie und Spektrophotometrie**

Die Spektroskopie ist ein Oberbegriff für verschiedene Messmethoden, bei denen von einer Probe emittierte, transmittierte oder reflektierte elektromagnetische Strahlung untersucht wird. Wird auch gleichzeitig, zum Beispiel mittels eines Detektors, aufgezeichnet, spricht man von Spektrophotometrie (Gressner und Arndt 2007).

Weißes Licht besteht aus einem Gemisch von Wellen unterschiedlicher Wellenlängen. Diese Erkenntnis geht auf Untersuchungen des Wissenschaftlers Sir Isaac Newton aus dem Jahre 1666 zurück, welcher Sonnenlicht mithilfe von Prismen in seine verschiedenen Spektralfarben zerlegte (Bergmann und Schäfer 2004). Im Jahre 1859 begründeten G. Kirchhoff und R.W. Bunsen die Grundlagen der Spektralanalyse und konstruierten den ersten Spektralapparat (Gehrcke 1927). Das menschliche Auge ist lediglich dazu in der Lage, Licht im Wellenlängenbereich von 380 bis 750 nm wahrzunehmen (Evenson 1999). Wird weißes (polychromatisches) Licht durch ein Prisma geleitet, werden die Teilwellen wellenlängenabhängig unterschiedlich stark gebrochen und das Licht in die einzelnen Spektralfarben zerlegt. Dieser Vorgang nennt sich Dispersion (Bergmann und Schäfer 2004). Es erscheint ein Farbstreifen mit den Farben Rot, Orange, Gelb, Grün, Blau, Indigo und Violett (Evenson 1999). Hierbei können die verschiedenen Wellenlängenbereiche den entsprechenden Farben zugeordnet werden (Abbildung 3). Bei modernen Spektrometern werden kleine Wellenlängenbereiche für Messungen isoliert. Hierfür werden Prismen, Gitter (Spektrophotometer) oder Filter (Filterphotometer) verwendet (Kricka und Park 2006).

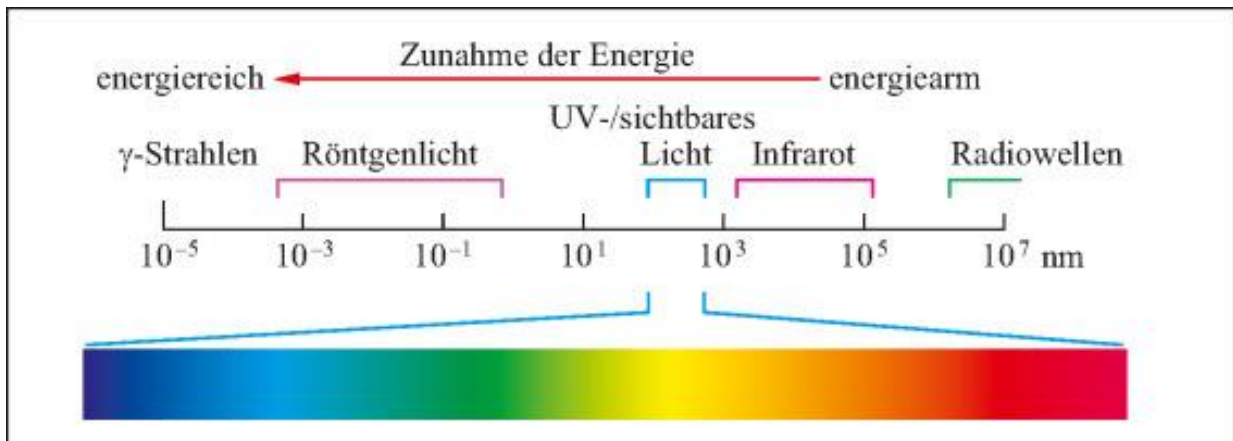


Abbildung 3: Bereiche elektromagnetischer Strahlung und zugehörige Wellenlängen (Zeeck 2017)

In welcher Farbe ein Stoff dem menschlichen Auge erscheint, hängt davon ab, in welchen Wellenlängenbereichen Licht absorbiert, transmittiert beziehungsweise reflektiert wird (Bergmann und Schäfer 2004). Die rote Farbe des Hämoglobins beispielsweise kommt dadurch zustande, dass in der Absorptionmessung kurzwelliges blaues Licht relativ stark absorbiert wird, wohingegen für langwelliges Licht im roten Spektralbereich eine hohe Durchlässigkeit vorliegt (Schmidt und Thews 1983).

### 2.5.1 Reflexionsspektroskopie

In dieser Arbeit erfolgten die Messungen mithilfe von *Reflexionsspektroskopie*, einer nicht-invasiven Messmethode, welche zur Analyse von lichtundurchlässigen und unlöslichen Stoffen oder Festkörpern dient. Ursprünglich für die Charakterisierung und Normung industrieller Produkte wie beispielsweise Farben, Textilien, Anstrichen und Papieren entwickelt, findet sie heute im biomedizinischen Bereich, beispielsweise bei der quantitativen Analyse von Gemischen fester Stoffe, bei der Oberflächenanalytik (Kortüm 1969), aber auch bei der in-vivo Hautanalyse (Anderson und Parrish 1981, Bohnert et al. 1999, 2005, Garcia-Urbe et al. 2011) Verwendung. Untersucht wird die von einer Fläche reflektierte Strahlung bezüglich ihrer spektralen Zusammensetzung. Hierbei kann es sich zum einen um *reguläre Spiegelreflexion* von einer ideal ebenen Oberfläche, *interne Spiegelreflexion* oder aber um *diffuse Reflexion* von einer ideal matten Oberfläche handeln. In der Realität kommen alle drei Reflexionstypen in unterschiedlichen Anteilen vor (Kortüm 1969, Schmidt 2000).

Die Intensität des reflektierten Lichts wird mit der Intensität von Licht, welches von einer Referenzoberfläche reflektiert wird, verglichen (Hapke 2011). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Medium Haut mit Leichenflecken handelt es sich um ein trübes, absorbierendes Medium (Anderson und Parrish 1981). Hierbei kommt es zu einer Vielzahl von Reflexions- und Streueffekten. Da die Intensität des reflektierten Lichts zur Konzentration des Analyts in so einem Fall nicht-linear ist, werden die Daten in ein lineares Format transformiert. Hierzu wird die Zweikonstantentheorie nach Kubelka und Munk verwendet, welche eine Theorie über diffuse Reflexion und Transmission in optisch trüben Medien darstellt und in etwa die gleiche Bedeutung wie das Lambert-Beer'sche Gesetz für die Absorptionsspektroskopie darstellt. Mithilfe dieser Theorie ist durch Reflexionsmessungen eine Darstellung von „Absorptionsspektren“ und eine Konzentrationsbestimmung von Stoffen in festen Körpern möglich (Hecht 1976, Evenson 1999, Schmidt 2000). In dieser Arbeit wurde die Extinktion (engl. *Absorbance*) aus der Reflektanz mithilfe der Software generiert und untersucht. Die Extinktion wird definiert als  $E = \log(I_0/I)$  ( $I_0$  = Intensität des einfallenden Lichts und  $I$  = Anteil des einfallenden Lichts nach Durchtritt durch eine Probe) und stellt einen einheitslosen Wert für die Gesamt-Lichtabschwächung durch eine Probe dar. Hierbei spielen neben der Absorption auch Abschwächungseffekte durch Streuung und Reflexion eine Rolle (Schmidt 2000). Die Darstellung erfolgte als Extinktionsspektrum in Form von Intensität als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$ .

### **2.5.2 Derivativspektroskopie**

Die Derivativspektroskopie ist eine wichtige Möglichkeit zur qualitativen und quantitativen Stoffanalyse und bedient sich der Ableitung von Spektren. Durch die Berechnung der 1., 2. oder n-ten Ableitung werden breite Absorptionsartefakte, wie z.B. durch Streuung nicht mehr erfasst und können so umgangen werden, was eine Anwendung in trüben Medien ermöglicht (Pingoud und Urbanke 1997, Schmidt 2000). Des Weiteren werden so auch kleine Veränderungen eines Spektrums besser sichtbar gemacht (Hesse et al. 2016) und einzelne Komponenten eines Mischspektrums aufgetrennt dargestellt (Abbildung 4) (Schmidt 2000). Die Derivativspektroskopie findet daher beispielsweise Anwendung in der Spurenanalyse.

Aus dem

Lambert-Beer-Gesetz  $E(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$

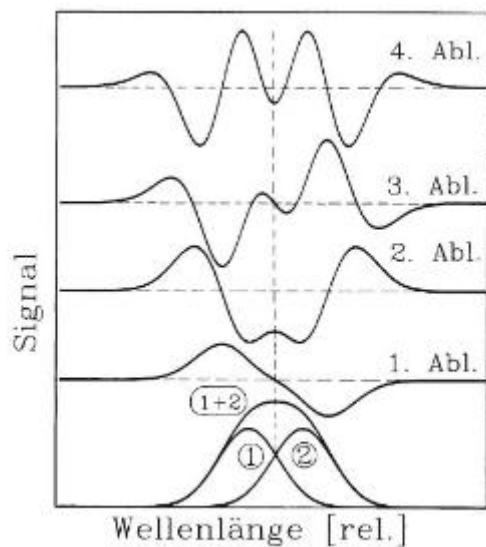
wird die

1. Ableitung  $\frac{dE}{d\lambda} = c \cdot d \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$

und hieraus die

2. Ableitung  $\frac{d^2E}{d\lambda^2} = c \cdot d \frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}$

gebildet (Hesse et al. 2016).



**Abbildung 4: Summenspektrum aus zwei gleichartigen Gaußkurven, erste bis vierte Ableitung (Schmidt 2000)**

Minima im Ursprungsspektrum werden zu Maxima in der zweiten Ableitung und umgekehrt. Mit jeder weiteren Ableitung erhöht sich die Zahl der Peaks: bei einer n-gipfligen Kurve hat die nächste Ableitung n+1 Peaks. Hierbei gilt: je höher die Ableitung des Spektrums, desto sensitiver, aber auch artefaktbehafteter werden Spuren von Substanzen dargestellt, welche im Ausgangsspektrum „versteckt“ gewesen sind. Daher wurde in dieser Arbeit die zweite Ableitung gewählt, um einen guten Kompromiss zwischen Sensitivität und vermehrtem Rauschen zu erhalten. Da die Höhe der Peaks der Ableitungsspektren eines untersuchten Stoffes der Formel nach direkt proportional zur vorliegenden Konzentration ist, können so quantitative Analysen durchgeführt werden (Schmidt 2000). Schmitt untersuchte bereits im Jahr 1977 die

Anwendung der Derivativspektroskopie zur quantitativen Analyse von Porphyrinen im Urin unter Laborbedingungen. Wie in Abbildung 5 und Abbildung 6 ersichtlich, ist die Peakdifferenz ( $\Delta A$ ) der zweiten Ableitung der Absorption hierbei direkt proportional zur Konzentration des untersuchten Stoffes im Urin (Schmitt 1977). Generell gilt daher, je größer die Peakdifferenz, desto größer die Konzentration des jeweils enthaltenen Stoffes. Die Derivativspektroskopie ist hierbei nicht auf Absorptionsspektren beschränkt, sondern kann für alle Typen von Spektren angewandt werden (Schmidt 2000).

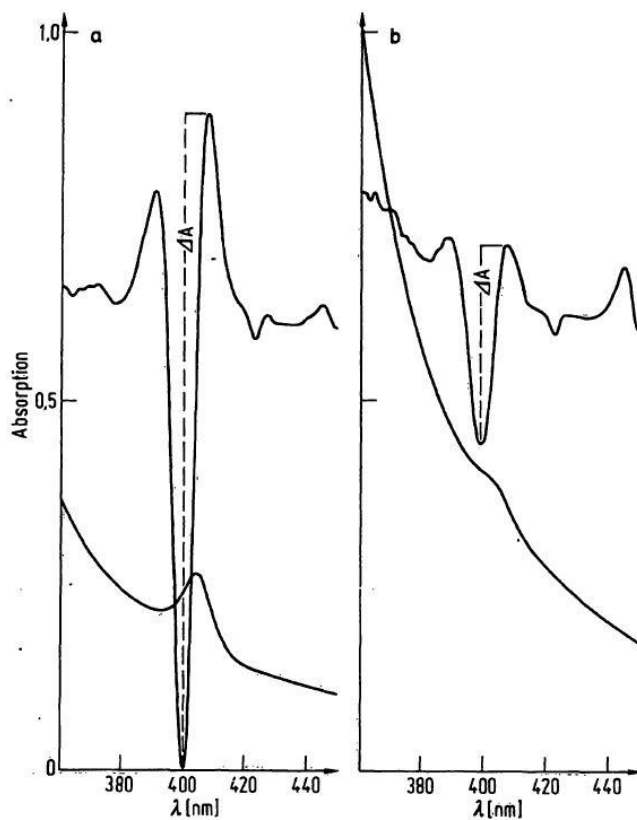


Abbildung 5: Normalspektrum und dessen 2. Ableitung eines angesäuerten, verdünnten Kontroll-Urins (a; 0,16  $\mu\text{mol/l}$  Gesamt-Porphyrin) und einer Urinprobe (b; 0,05  $\mu\text{mol/l}$  Gesamt-Porphyrin), X-Achse: Wellenlänge  $\lambda$  [nm], Y-Achse: Absorption A,  $\Delta A$ =Peakdifferenz (Schmitt 1977)

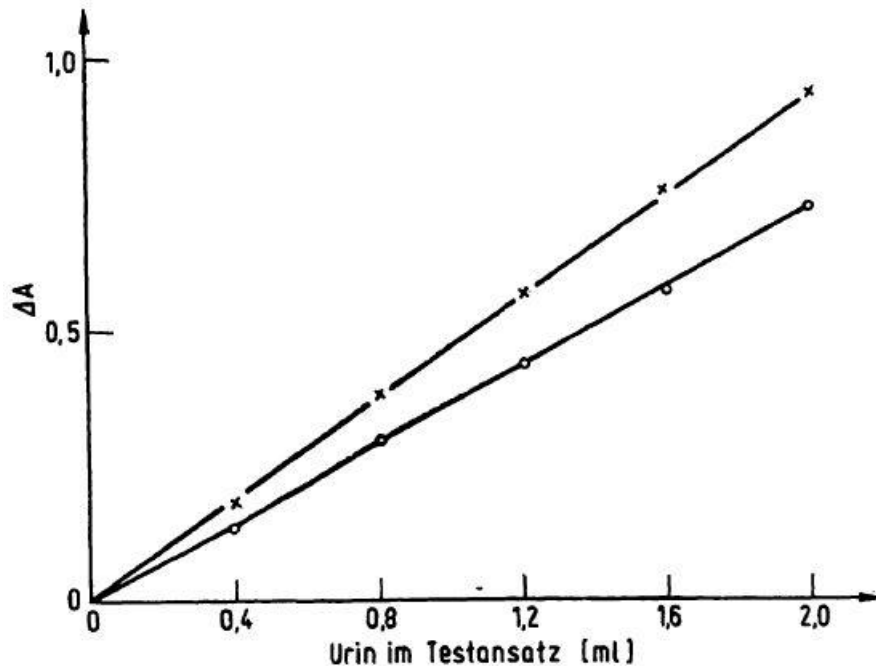


Abbildung 6: Linearität der Porphyrinbestimmung durch Derivativspektroskopie. Ergebnisse mit Verdünnungsreihen von zwei Urinen mit erhöhter Porphyrinkonzentration (Schmitt 1977)

### 2.5.3 NIR-Spektroskopie

NIR-Spektroskopie bezeichnet ein Verfahren für optische Messungen im Wellenlängenbereich von 800 bis 2500 nm, welches nahem Infrarot (NIR) entspricht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, NIR-Spektren darzustellen. Für flüssige oder gasförmige Proben steht die Darstellung in Absorption oder Transmission zur Verfügung. Die gängigste Methode ist die in Reflexion gemessene Absorption, sodass in-vivo-Messungen und non-destruktive Messungen an Festkörpern vorgenommen werden können (Schmidt 2000).

Eingeführt wurde die NIR-Spektroskopie bereits im Jahre 1977 (Jöbssis 1977). Sie wird zu Messungen in Agrar-, Lebensmittel-, Petro- und Pharmaindustrie (Kessler 2006), aber auch im medizinischen Bereich genutzt. Der Vorteil für die in-vivo Untersuchung von biologischem Gewebe liegt hierbei darin begründet, dass die meisten Gewebe relativ gut durchlässig für infrarotes Licht im Bereich nahe dem visuellen Spektrum sind und somit tiefere Gewebeschichten erreicht werden (Gauglitz und Moore 2014). Einsatzbereiche in der Medizin sind unter anderem die nicht-invasive kontinuierliche Überwachung von regionaler Sauerstoffsättigung des Blutes (Chakravarti et al. 2008), das Monitoring der zerebralen Perfusion (Tomita et al. 2006, Taillefer und Denault 2007), die Überwachung des Blutflusses in der Muskulatur (Mesquita et al. 2011), die



Überwachung der Organperfusion bei Lebertransplantationen (Mitsuta et al. 2006), und zum Neuroimaging (Hoshi 2003), um nur einige Beispiele zu nennen. In den letzten Jahren konnten technische Verbesserungen erreicht und die Zuverlässigkeit dieser Methode erhöht werden, sodass die NIRS mehr und mehr im klinischen Alltag Verwendung findet (Scheeren et al. 2012). In dieser Arbeit erfolgten die Messungen im Bereich von sichtbarem Licht (VIS) und im nahinfraroten Bereich (NIR).

## **2.6 Optische Eigenschaften von Hämoglobin**

In dieser Arbeit wurden die Referenzspektren und die zugehörigen zweiten Ableitungen mittels einer Software der Firma DERMALOG gebildet und untersucht (Abbildung 8 und Abbildung 9). Mithilfe des Programmes wurde die zweite Ableitung der Absorbance generiert und für die vorliegende Studie ausgewertet. Untersucht wurden die Hämoglobinderivate Oxyhämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ), reduziertes Hämoglobin (RHb), Methämoglobin (MetHb) und Kohlenmonoxidhämoglobin (COHb).

Oxygeniertes Hämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) ist makroskopisch hellrot und hat zwei prominente Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 577 nm und 542 nm. Dazwischen liegt ein Minimum bei 560 nm. In der zweiten Ableitung des Spektrums finden sich drei Maxima bei 521, 563 und 591 nm und zwei Minima bei 542 und 578 nm.

Reduziertes Hämoglobin (RHb) ohne gebundene Sauerstoffmoleküle ist makroskopisch düsterrot bis rot-livide und hat eine Absorptionsbande, deren Maximum im Absorptionsspektrum bei 560 nm liegt, sowie ein weiteres kleines Maximum bei 760 nm (Schwerd 1961b). In der zweiten Ableitung gibt es jeweils vier Maxima (495, 532, 577 und 604 nm) und vier Minima (511, 553, 589 und 759 nm).

Methämoglobin (MetHb) ist bei saurem pH-Wert braun und nimmt bei alkalischem pH-Wert eine rot-bräunliche Färbung an. Daher ändern sich die Absorptionsspektren in Abhängigkeit vom pH-Wert, sodass Methämoglobin zwischen den pH-Werten 5 und 10 als ein pH-Indikator fungiert (Schwerd 1961b). Das Referenzspektrum, mit dem gearbeitet wurde, entspricht dem MetHb bei einem pH-Wert von 7,0, da bei Verstorbenen im Rahmen der Autolyse der ehemals physiologische pH-Wert von 7,4 im Verlauf langsam absinkt (Tsokos 2005a). Hier liegen in der zweiten Ableitung vier Maxima (526, 558, 655 und 792 nm) und vier Minima (502, 541, 580 und 636 nm) vor. Bei Kohlenmonoxidhämoglobin (COHb) welches leuchtend hellrot imponiert, liegen die Absorptionsmaxima bei 539 nm und 569 nm. Bei Betrachtung der zweiten Ableitung

finden sich drei Maxima bei 516 nm, 555 nm und 587 nm und zwei Minima bei 538 nm und 571 nm (Abbildung 8 und Abbildung 9).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Verstorbene**

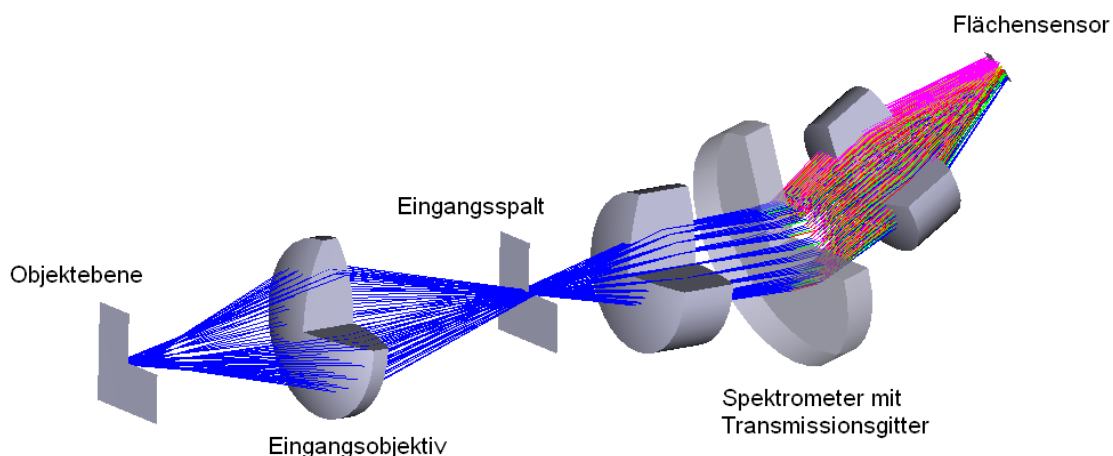
Insgesamt wurden an 48 Leichen spektrophotometrische Messungen vorgenommen. Relevantes Kriterium für die Hämoglobinderivatmessreihe war ein definierter und dokumentierter Todeszeitpunkt mit einem maximalen postmortalen Intervall von 11,5 Stunden.

In die Kohlenmonoxidmessreihe wurden Verstorbene mit begründetem Verdacht (Auffindesituation, hellrote Leichenflecken) auf Kohlenmonoxidintoxikation eingeschlossen; dies geschah unabhängig vom Todeszeitpunkt und postmortalem Intervall. Ausschlusskriterien waren demnach ein unbekannter Todeszeitpunkt sowie ein postmortales Intervall von mehr als 11,5 Stunden (für die Hämoglobinderivatmessreihe), Polytrauma oder anderweitiger größerer Blutverlust, ausgedehnte Anasarka, Ikterus, im Vorfeld bekannte Blutgerinnungsstörung, vorangegangene Kühlung in Kühlfächern, Alter jünger als 16 Jahre und sehr spärliche Leichenfleckausprägung. Die Messungen wurden ausschließlich an nicht obduzierten Leichen vorgenommen.

#### **3.2 Spektrometer**

Die Firma DERMALOG konstruierte in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf ein Spektrometer, mit dessen Hilfe die Absorptionsspektren einzelner Hämoglobinderivate im Bereich von Leichenflecken aufgenommen und gemessen werden können. Der Messbereich lag zwischen 490 nm (VIS) und 800 nm (nahes Infrarot), gemessen wurde in Reflexion. Um den Anpressdruck anpassen zu können, wurde ein Drucksensor in den Spektrometerkopf eingebaut. Die Untersuchung der Wegdrückbarkeit frischer Livores im zeitlichen Verlauf nach dem Tod mithilfe desselben Geräts war hierbei Thema einer weiteren Dissertation im Institut für Rechtsmedizin Hamburg.

Abbildung 7 zeigt schematisch den Strahlengang im Inneren des Spektrometers: Das einfallende Licht wurde aus der Objektebene, dort wo der Spektrometerkopf die Haut berührt, durch das FIFO-IR4.2BM Eingangsobjektiv (Brennweite  $f = 4,2 \text{ mm}$ ; NIR optimiert, S-Mount) auf den Eingangsspalt abgebildet und dann am holografischen Transmissionsgitter mit 300 Linien/mm wellenlängenabhängig flektiert. Hierbei wurden kürzere Wellenlängen stärker gebeugt als längere Wellenlängen. Als Spektrometerobjektiv fungierte ein FIFO-IR16BM-Objektiv (Brennweite  $f = 16 \text{ mm}$ ; NIR optimiert, S-Mount). Anschließend traf das Licht auf den 2D-Kamerasensor (Aptina MT9M032; CMOS Image Sensor; aktive Sensorgröße  $3,24 \text{ mm (H)} \times 2,41 \text{ mm (V)}$ ; Pixelgröße:  $2,2 \text{ }\mu\text{m} \times 2,2 \text{ }\mu\text{m}$ ), sodass in jeder Zeile des Kamerasensors ein Absorptionsspektrum abgebildet wurde.



**Abbildung 7: Strahlengang im Spektrometer, schematisch (aus dem Konstruktionsblatt der Firma DERMALOG)**

Diese Zeilen wurden zusammengefasst und ein Mittelwertspektrum erzeugt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Die spektrale Auflösung betrug  $6 \text{ nm}$ , limitiert durch die Spaltgröße, die Objektivbrennweiten und die Pixelgröße. Zur Beleuchtung dienten zwei OSA OCI 440 VIS+NIR LEDs mit grünem Fluoreszenzfarbstoff ( $350 \text{ mA}$ ).

Zum einen musste der Spektrometerkopf vollständig auf der Haut aufliegen, um den Einfall von Umgebungslicht zu verhindern; zum anderen durfte kein Druck ausgeübt werden, um frische Leichenflecken nicht durch zu hohen Anpressdruck wegzudrücken und somit die Spektren zu verfälschen. Daher wurden Stifte zur Kraftübertragung in

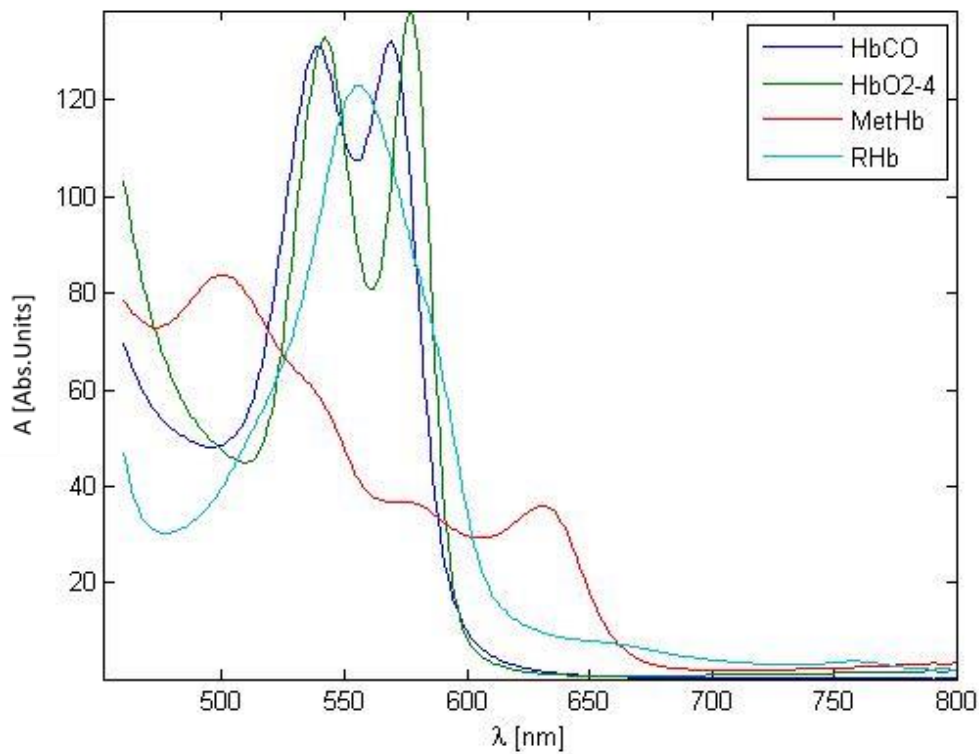
den Sensorkopf integriert und der Druck per Kraftaufnehmer im Gehäuse registriert. Die Messungen dieser Arbeit wurden ohne Druck durchgeführt, d.h. bei 0 Newton. Das Spektrometer wurde so konfiguriert, dass die Messung nur erfolgte, wenn der Anpressdruck im Bereich von null Newton mit einer Abweichung von maximal einem Newton lag. Wenn der Anpressdruck ein Newton überstieg, wurde der Messvorgang so lange unterbrochen, bis der Druck wieder im angegebenen Intervall lag (Daten und Abbildung mit freundlicher Genehmigung entnommen aus dem Konstruktionsblatt der Firma DERMALOG).

### **3.3 Software**

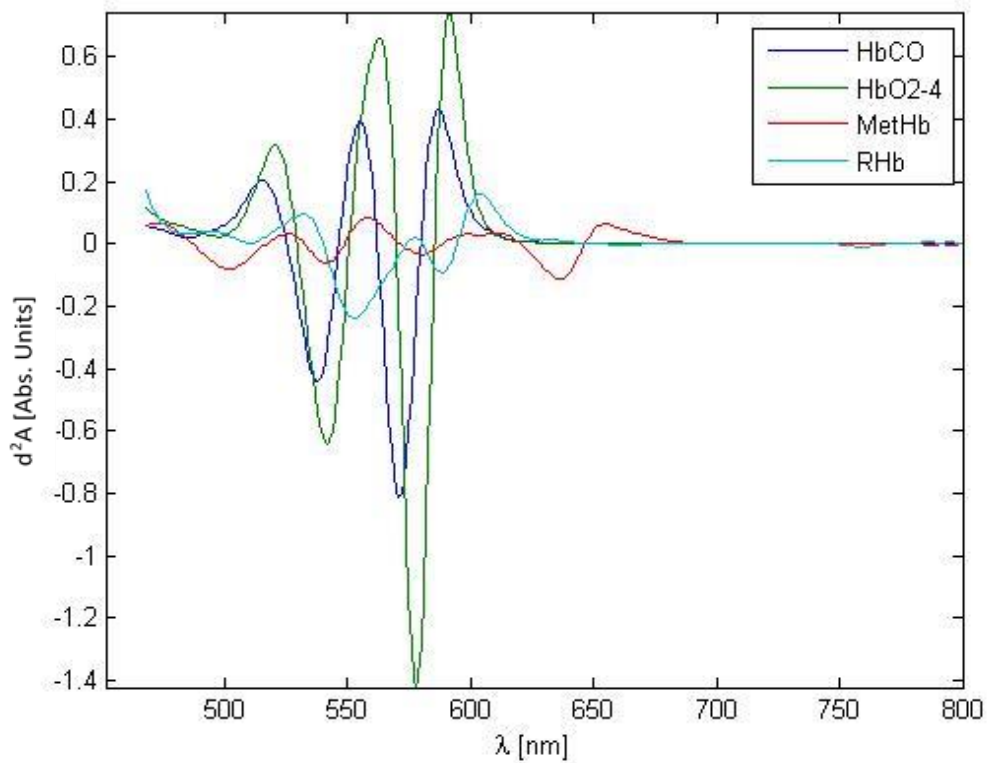
Ebenso wie das Spektrometer wurde die dazugehörige Software von der Firma DERMALOG entwickelt.

Das Spektrometer wurde mithilfe eines USB-Kabels an den verwendeten Laptop angeschlossen und das Programm gestartet. Dann erfolgten die Messungen, die Bedienung erfolgte ausschließlich über die Benutzeroberfläche des Programms. Die aufgenommenen Spektren ließen sich unmittelbar nach der Messung einzeln oder gruppiert darstellen.

Mithilfe von bekannten wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten für die reinen Substanzen, also humanes RHb, HbO<sub>2</sub>, COHb und MetHb, wurden die zugehörigen Spektren (Abbildung 8) und die zweite Ableitung dazu (Abbildung 9) simuliert.



**Abbildung 8: Referenzspektren der unterschiedlichen humanen Hämoglobinderivate, Simulation mithilfe bekannter Extinktionskoeffizienten. X-Achse: Wellenlänge  $\lambda$  [nm], Y-Achse: Absorbance**



**Abbildung 9: Referenzspektren der unterschiedlichen Hämoglobinderivate in zweiter Ableitung, Simulation mithilfe bekannter Extinktionskoeffizienten. X-Achse: Wellenlänge  $\lambda$  [nm], Y-Achse: Zweite Ableitung der Absorbance  $d^2A$**

Der Weißabgleich erfolgte per mitgelieferter Kachel, eine Messung zur Normierung der Absorptionsspektren erfolgte mithilfe eines Referenzbildes aus einem benachbarten Hautbereich ohne Leichenflecken, welcher als individueller Nullwert definiert wurde. Um weitere optischen Störeffekte wie Streuung oder unbekannte Absorptionsanteile zu minimieren wurde mit Derivativspektroskopie gearbeitet und die zweite Ableitung der Absorbance  $d^2A$  gebildet. Im Vorfeld war eine umfangreiche Datenmatrix durch Erhebung im Rahmen einer Vorstudie erstellt worden. Es erfolgte eine multivariate Auswertroutine per LSQ-Fit der Datenmatrix gegen die Referenzspektren durch DERMALOG. Mithilfe der Software wurde nach der Aufnahme der Spektren eine Excel-Datei erstellt, in der Werte für HbO<sub>2</sub>, RHb, MetHb und COHb in Prozent ausgegeben wurden. Diese Werte entsprachen keinen absoluten Werten, machten jedoch eine intraindividuelle Vergleichbarkeit möglich (im Sinne von Zunahme oder Abnahme im zeitlichen Verlauf).

### **3.4 Messverfahren**

Es erfolgten zwei Messreihen, welche zeitlich parallel durchgeführt wurden: eine Messreihe zur Untersuchung der Hämoglobinderivate in den Leichenflecken im zeitlichen Verlauf und eine zweite Messreihe an Verstorbenen mit mutmaßlicher Kohlenmonoxidintoxikation und hellroten Leichenflecken.

Die Dokumentation der Messungen erfolgte auf hierfür entworfenen Dokumentationsbögen (Anhang VI.II Dokumentationsbogen). Neben den spektrophotometrischen Messungen wurden Metadaten über die Verstorbenen erhoben. Hierzu gehörten Alter, Geschlecht, Körpergröße, Körpergewicht, BMI, Todesursache, Todeszeitpunkt, vorhandene Unterlagen (Todesbescheinigung, Notarztprotokoll, Leichenbericht etc. in anonymisierter Form) und zu den jeweiligen Einzelmessungen zusätzlich Hauttemperatur, Rektaltemperatur, Ausprägung und Farbe, sowie Wegdrückbarkeit und Konfluktionszustand der Leichenflecken.

Bei der Hämoglobinderivatmessreihe wurde an folgenden festgelegten Zeitpunkten gemessen: jeweils nach 5,5 Stunden, 11,5 Stunden, 17,5 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden post mortem. Diese Messzeitpunkte orientierten sich an zeitlichen Eckpunkten zu postmortalen Eigenschaften von Totenflecken, welche der gängigen Tabelle von Henssge et al. entnommen wurden (Henssge und Madea 1988).

Zu Beginn der Messreihen wurde der Leichnam bei Raumtemperatur gelagert; diese lag bei durchschnittlich 21,5°C. Nach 36 Stunden post mortem wurde der Verstorbene in einen Raum mit einer Umgebungstemperatur von durchschnittlich 12,0°C gebracht, wo er bis zum Ende der Messreihe verblieb. Mithilfe eines Temperaturloggers, welcher während des Messzeitraums neben der Leiche positioniert wurde, konnte über den gesamten Zeitraum die Lufttemperatur der Umgebung erfasst werden. Es handelte sich hierbei um einen DL-120 TH USB-Feuchte-/Temperatur Logger der Marke *Voltcraft* mit eingebauter Lithiumbatterie. Das Auslesen der gesammelten Temperaturdaten erfolgte mithilfe der zugehörigen Temperaturlogger-Software. Die Hauttemperatur wurde jeweils zu den Messzeiten auf dem untersuchten Hautbereich mit Leichenflecken mit einem Infrarot-Thermometer vom Typ IR 260-8S der Marke *Voltcraft* gemessen. Die Rektaltemperatur wurde mit einem institutseigenen *testo*-Rektalthermometer ca. acht Zentimeter tief im Rektum des Verstorbenen erfasst. Vor den eigentlichen Messungen wurde, wie oben erläutert, im Bereich leichenfleckfreier Haut in unmittelbarer Nähe des untersuchten Leichenflecks ein Weißabgleich ohne Druck, das heißt mit Null Newton, mit dem Spektrometer aufgenommen.

Dazu wurde sowohl für den Weißabgleich als auch für die Messungen an sich, jeweils ein geeigneter ca. fünf mal fünf Zentimeter messender, rechteckiger Bereich mit einem wasserfesten Stift in Form von vier Eckpunkten markiert. Die Messungen erfolgten im zeitlichen Verlauf stets an dieser markierten Stelle (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Markierungen für die Messung im Bereich eines Leichenfleckes über dem rechten M. deltoideus; 46-jähriger, männlicher Verstorbener**

Für die Messung mit dem Spektrometer musste die Hautstelle trocken und sauber sein und durfte keine starke Behaarung, Blutantragungen, Reste von färbendem Desinfektionsmittel, Pigmentflecken, Hämatome oder Vibices aufweisen. Gemessen wurde im Bereich des Schulterblatts, des M. deltoideus oder der Flanke, je nach Lokalisation, Ausprägung und Beschaffenheit der Livores.

Bei der Durchführung der Messungen war es wichtig, den Messkopf senkrecht zur Hautoberfläche anzusetzen und möglichst ohne Druck zu arbeiten (Abbildung 11).





**Abbildung 11: Durchführung der Messung mit dem Spektrometer der Firma DERMALOG**

Bei der Kohlenmonoxid-Messreihe erfolgten die Messungen nur zu einem einzigen Zeitpunkt kurz nach Aufnahme im Institut, da hier bei allen Verstorbenen der Todeszeitpunkt unbekannt war. Die Einzelmessungen erfolgten wie oben beschrieben, auch Umgebungs-, Haut- und Rektaltemperatur wurden wie oben geschildert erfasst und ein Dokumentationsbogen geführt. Zusätzlich wurde Herzblut entnommen und mithilfe eines *Dr. Lang-Photometers* in der Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin per Methode nach *Hüfner und Heilmeyer* spektrophotometrisch auf den prozentualen Carboxyhämoglobin-Gehalt untersucht.

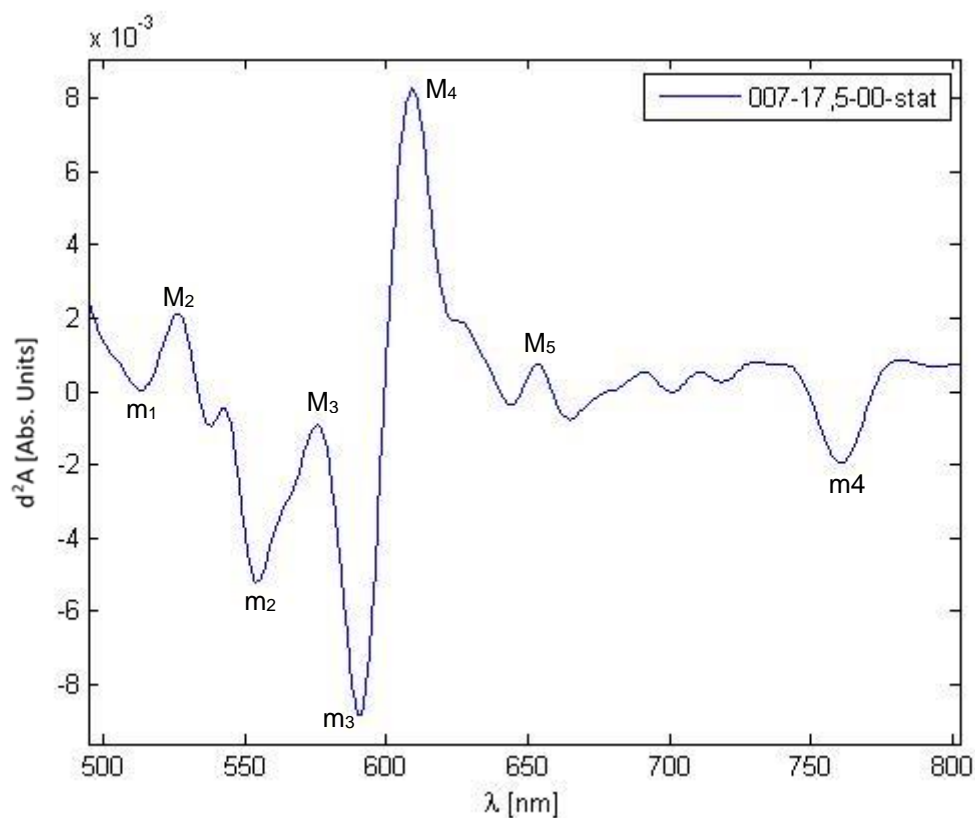
### **3.5 Datenauswertung**

Das Erheben und die Auswertung der Daten erfolgten mit Microsoft Excel 2010 und 2018 und IBM SPSS Statistics 22. Die Begutachtung und Analyse der aufgenommenen Spektren wurde mithilfe der Software der Firma DERMALOG durchgeführt. Zur Auswertung wurden zuerst die zweite Ableitung der Spektren der Verstorbenen mit dem gleichen Messzeitpunkt verglichen, um Gemeinsamkeiten der

Verläufe darzustellen. Hierbei wurden die Wellenlängen von 490 bis 780 nm als relevanter Bereich eingestuft und untersucht.

### *Hämoglobinderivat-Messreihe*

Es wurden die in allen Fällen makroskopisch vorhandenen Maxima ( $M_2$  bis  $M_5$ ) und Minima ( $m_1$  bis  $m_4$ ) benannt, um eine deskriptive Analyse zu ermöglichen (Abbildung 12). Hierbei war die Zuordnung mit dem bloßen Auge sehr gut möglich. Ein Maximum  $M_1$ , welches anfangs bei einigen gemessenen Fällen vorhanden war, war in späteren Messungen nicht zu sehen, daher entfiel es bei der Auswertung.



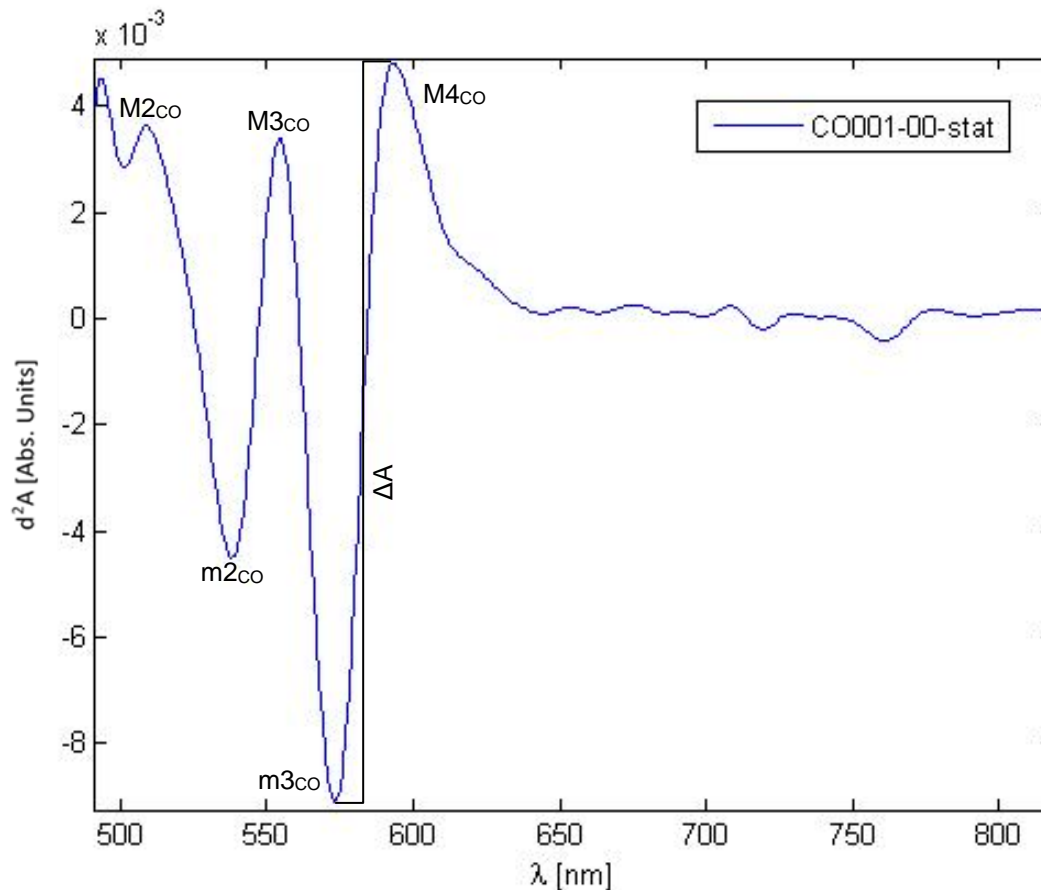
**Abbildung 12: Beispielhaft das Spektrum von Fall 007, 17,5h-Messung, 2. Ableitung, mit Beschriftung der Extrema**

Später wurden die Spektren der Fälle einzeln untersucht und die genaue Wellenlängen-Lokalisation der Minima und Maxima mit zugehörigen Intensitäten erfasst. Dies geschah im zeitlichen Verlauf, d.h. alle Spektren eines einzelnen Falles zu verschiedenen Zeitpunkten. Danach wurden die Spektren mit den Referenzspektren der einzelnen Hämoglobinderivate (RHb, COHb, HbO<sub>2</sub> und MetHb) verglichen, um eventuell vorhandene ähnliche Kurvenverläufe und Lokalisationen der

Maxima und Minima zu explorieren, sowie eine mögliche Kältereoxygenierung beziehungsweise Änderung der Zusammensetzung der Livores aufzudecken. Mithilfe der Software wurden Prozentwerte für die einzelnen Hämoglobinderivate vom Gesamthämoglobin im Leichenfleck eines Verstorbenen ausgegeben. Diese entsprachen keinen absoluten Werten, machten jedoch einen intraindividuellen Vergleich möglich. Ziel war es, die Änderungen der Hämoglobinderivate im zeitlichen Verlauf herauszuarbeiten, also ob ein Anstieg, ein Absinken oder keine Änderung im zeitlichen Verlauf erfolgte.

### *Kohlenmonoxid-Messreihe*

Für die Analyse der Kohlenmonoxid-Fälle wurden die Spektren gesichtet und die Maxima mit  $M_{2CO}$ ,  $M_{3CO}$  und  $M_{4CO}$  und die Minima mit  $m_{2CO}$  und  $m_{3CO}$  benannt, analog zur Hämoglobinderivate-Messreihe (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung der 2. Ableitung des Absorptionsspektrums von CO-Fall 001 mit Beschriftung der Extrema**

Anschließend wurde die Differenz der Absorbance  $\Delta A$  in der zweiten Ableitung zwischen den Messpunkten m3CO und M4CO berechnet und mit den im Labor gemessenen Carboxyhämoglobinwerten verglichen.

### **3.5.1 Statistische Auswertung**

Die weitere Auswertung umfasste deskriptive Statistiken (Mittelwert  $\bar{x}$ , Median  $\tilde{x}$ , Varianz  $s^2$ , 95%-Konfidenzintervall 95%CI, Minimum, Maximum, Standardabweichung SD), die Spearman-Korrelation, den Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test zur Testung auf Normalverteilung, den Exakten Test nach Fisher und den Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten.

### **3.6 Ethikvotum**

Es wurden keine invasiven Eingriffe an den Leichnamen vorgenommen, beziehungsweise die durchgeführten Blutentnahmen entsprachen dem geregelten Procedere eines jeden eingelieferten Leichnams im Institut für Rechtsmedizin. Alle Daten wurden anonymisiert erfasst und gespeichert, und alle fotografischen Aufnahmen so angefertigt, dass der oder die Verstorbene nicht identifizierbar war, entsprechend dem Hamburgischem Krankenhausgesetz (HmbKHG) §12(1).

## **4 Ergebnisse**

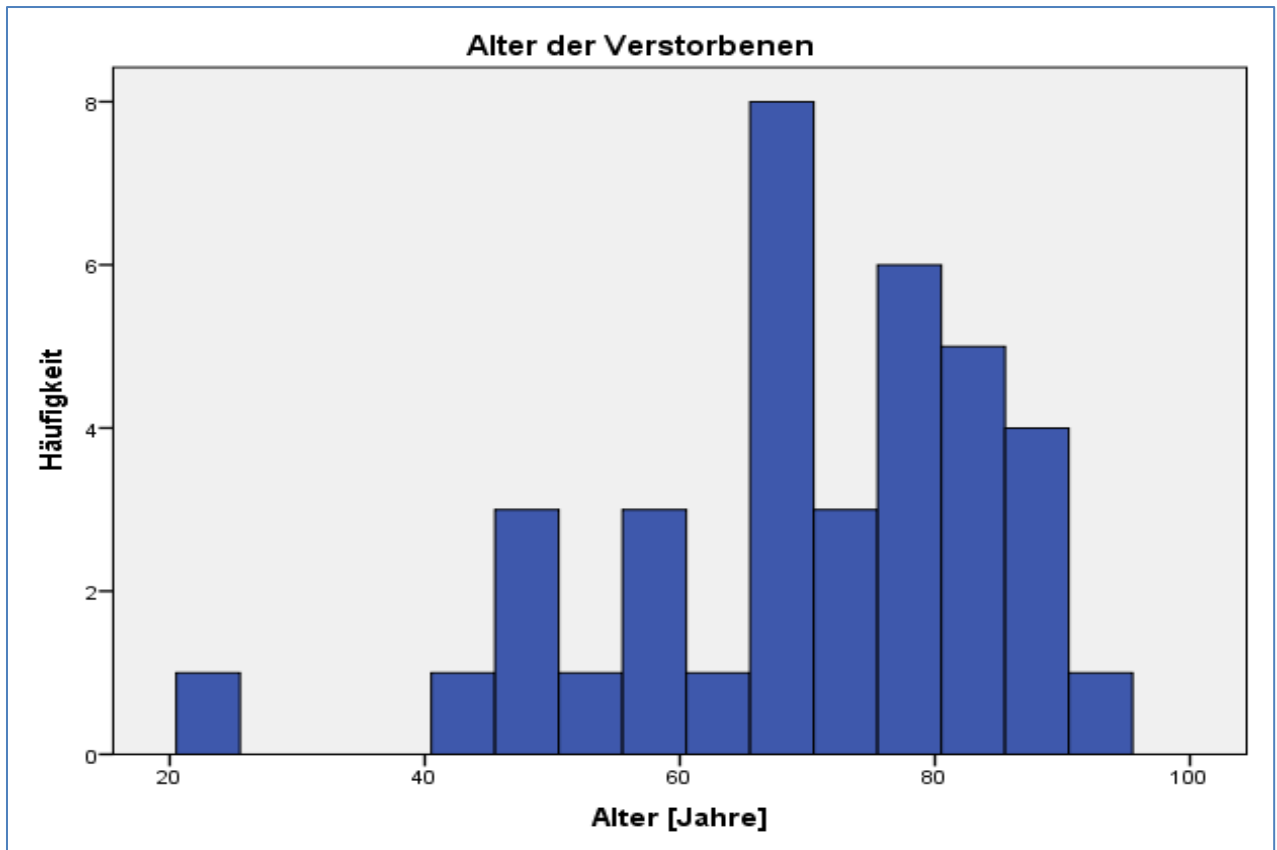
Insgesamt wurden Messungen an 48 Verstorbenen vorgenommen, davon 40 Fälle für die Messreihe zur Untersuchung der Hämoglobinderivate und acht Fälle für die Kohlenmonoxid-Messreihe. Tabelle 5 und Tabelle 6 im Anhang zeigen eine Übersicht der untersuchten Fälle. Zwei Fälle fielen aufgrund von Softwareproblemen und einer wegen technischer Probleme mit dem Spektrometer<sup>1</sup> für die Messreihe zur Untersuchung der Hämoglobinderivate heraus. Ein Kohlenmonoxid-Fall wurde für die Gesamtauswertung ausgeschlossen, weil sich in der toxikologischen Untersuchung der Anfangsverdacht einer Intoxikation nicht bestätigte und die Verstorbene somit für die Kohlenmonoxid-Messreihe ausschied. Dieser Fall wurde anschließend separat betrachtet. Somit ergaben sich insgesamt 44 Fälle; 37 für die Hämoglobinderivate-Messreihe mit insgesamt 176 Einzelmessungen und sieben für die Kohlenmonoxid-Messreihe.

### **4.1 Untersuchung der Hämoglobinderivate**

Die Messungen erfolgten an 37 Verstorbenen, davon waren 25 männlich (67,6%) und 12 weiblich (32,4%). Abbildung 14 zeigt eine Übersicht über das Alter der Verstorbenen. Die Jüngste war 23 und der älteste Verstorbene war 94 Jahre alt geworden. Der Median lag bei 70 Jahren. Die ermittelten BMI-Werte lagen zwischen 15,98 und 38,26 kg/m<sup>2</sup> (Median: 27,77 kg/m<sup>2</sup>).

---

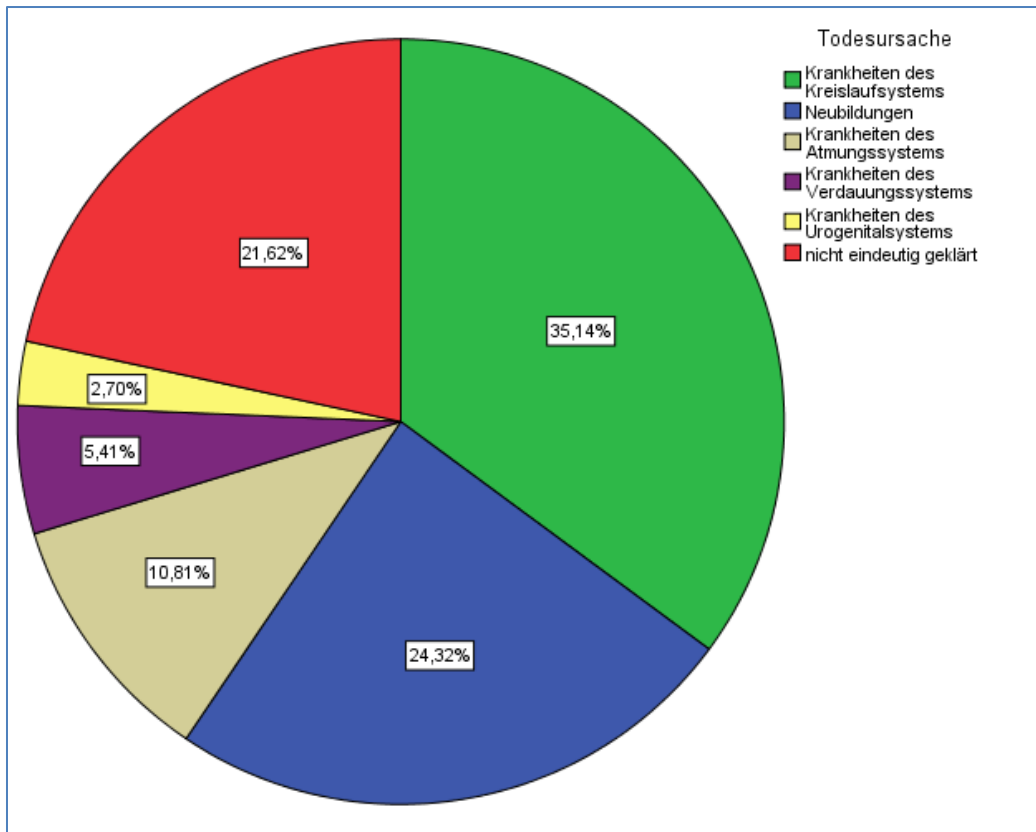
<sup>1</sup> Nachdem das Gerät bei einem Messvorgang (Fall 24) mechanisch beschädigt wurde, erfolgte eine Reparatur durch die Firma DERMALOG. Fall 24 wurde für die Auswertung ausgeschlossen. Bei den darauffolgenden Messungen war das Raster für die Wellenlängen verschoben, es fanden sich um 38 nm nach rechts verlagerte Spektren. Mithilfe der Software war es möglich, das Raster digital zurück zu verschieben, ohne dass hierbei die erhobenen Daten verändert wurden, sodass hier von einem systematischen Fehler ausgegangen wurde und die korrigierten Werte in die Auswertung mit einbezogen wurden.



**Abbildung 14: Alter der Verstorbenen [Jahre], Hb-Derivate-Messreihe**

Die Einteilung der Todesursachen erfolgte nach den Kategorien der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation WHO (DIMDI 2018).

Neun Personen der Studie waren aufgrund von Neubildungen (Neoplasien) verstorben (24,3%), vier an Krankheiten des Atmungssystems (10,8%), zwei an Erkrankungen des Verdauungssystems (5,4%) und eine an einer Erkrankung des Urogenitaltraktes (2,7%). Bei einem Großteil der Verstorbenen waren Krankheiten des Kreislaufsystems todesursächlich (13 Personen, 35,1%), acht verstarben aus nicht eindeutig geklärter Ursache (21,6%) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Todesursachen der Verstorbenen nach ICD-10 der WHO**

Es wurden an 37 Verstorbenen spektrophotometrische Messungen an bis zu sechs Zeitpunkten nach dem Tod durchgeführt. In den ersten 24 Stunden wurden die Leichen bei Raumtemperatur gelagert und ab 36 Stunden in einem Raum mit 12°C Raumtemperatur aufbewahrt. Am Zeitpunkt 5,5 Stunden konnten bei 22 Fällen Messungen durchgeführt werden, bei 11,5 und 17,5 Stunden bei allen 37 Fällen. Bei 33 Fällen fand eine 24-Stunden-Messung statt, bei 30 eine 48- und bei 17 eine 72-Stunden-Messung. Somit ergaben sich 176 Einzelmessungen (Tabelle 1).

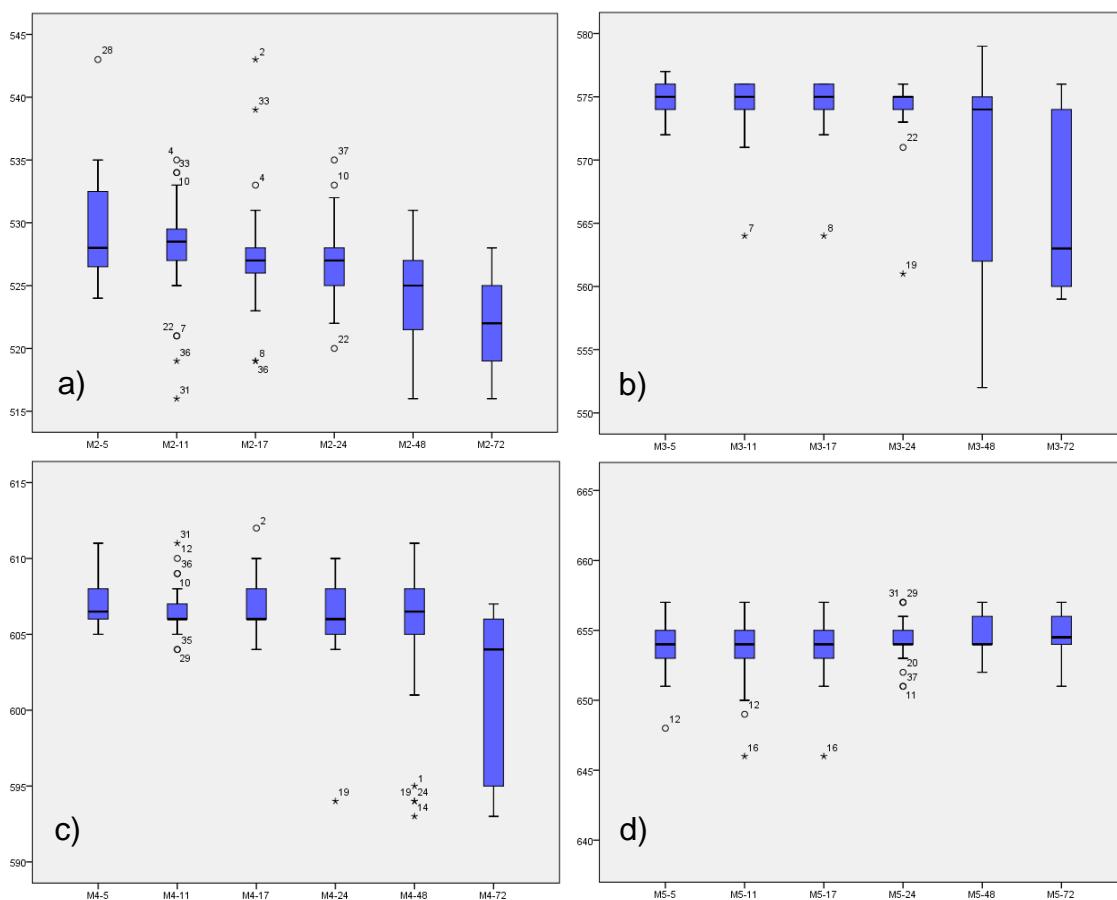
**Tabelle 1: Zahl der Messungen zu den jeweiligen Messzeitpunkten [h]**

Messzeitpunkt [h post mortem]	Häufigkeit	Prozent
Gültig 5,5h	22	12,5
11,5h	37	21,0
17,5h	37	21,0
24h	33	18,8
48h	30	17,0
72h	17	9,7
Gesamt	176	100,0

### 4.1.1 Lokalisation der Minima und Maxima im zeitlichen Verlauf

Im Folgenden wurde die Lage der Peaks und Dips im zeitlichen Verlauf genauer betrachtet. Für eine bessere Übersicht wurden Boxplots der Wellenlängen für die einzelnen Extrema erstellt und die verschiedenen Zeitpunkte (5,5h - 11,5h - 17,5h - 24h - 48h - 72h) nebeneinander aufgetragen.

Zunächst wurden die Lokalisationen der Maxima untersucht (Abbildung 16). Die Mediane sind innerhalb der ersten 24 Stunden ähnlich; während dieses Zeitraumes ließ sich keine Änderungstendenz erkennen.

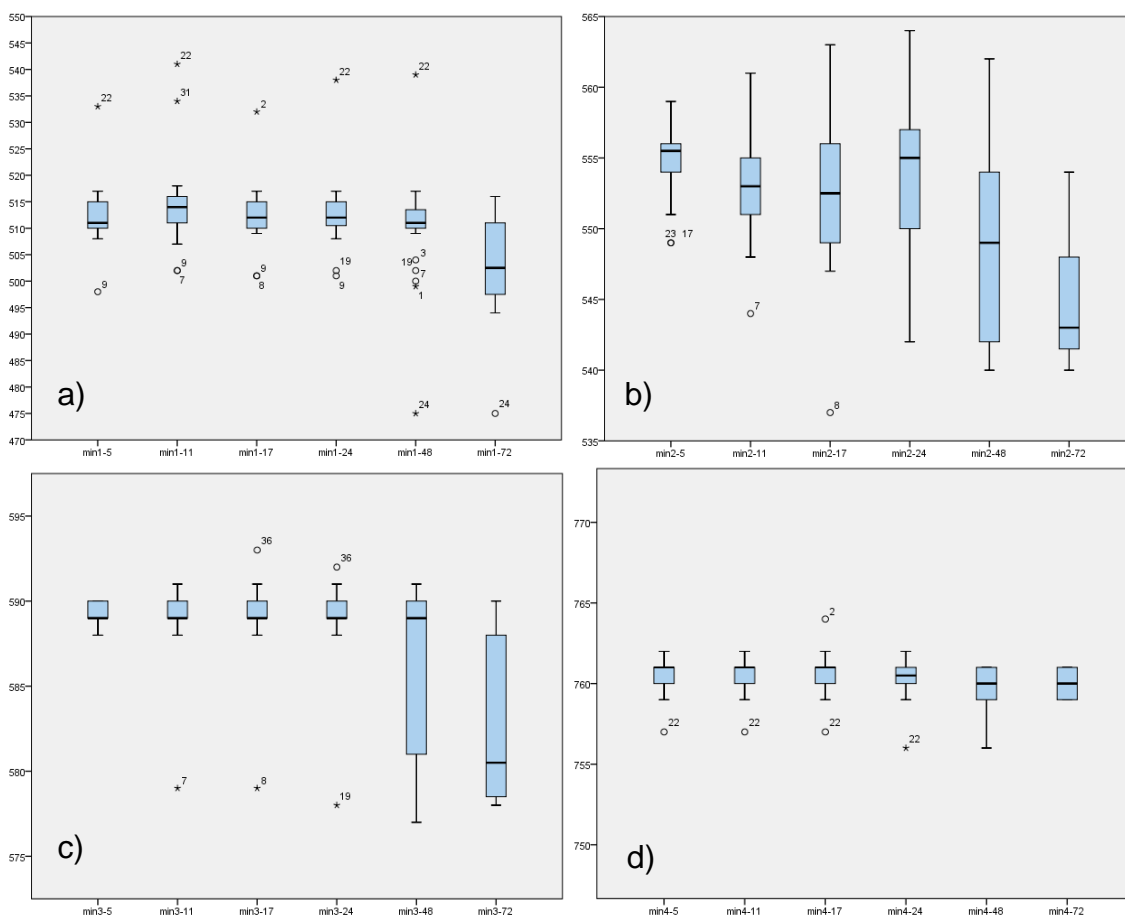


**Abbildung 16: Maxima M2 (a), M3 (b), M4 (c), M5 (d), Boxplots der Lokalisationen im zeitlichen Verlauf, X-Achse: Zeitpunkt [h post mortem], Y-Achse: Wellenlängen [nm]**

Nach 48 und 72 Stunden fand teilweise eine Veränderung statt. Hier verschob sich der Median in Richtung kürzerer Wellenlängen (M2, M3, M4 ab 72h). Diese Veränderung war lediglich beim Maximum M5 nicht zu sehen. Die Streuung erschien sehr uneinheitlich. Auffällig war, dass die Streuung bei späteren Zeitpunkten trotz kleinerer Fallzahlen zunahm und gleichzeitig weniger Ausreißer vorhanden waren (M2, M3, M4 ab 72h, M5).

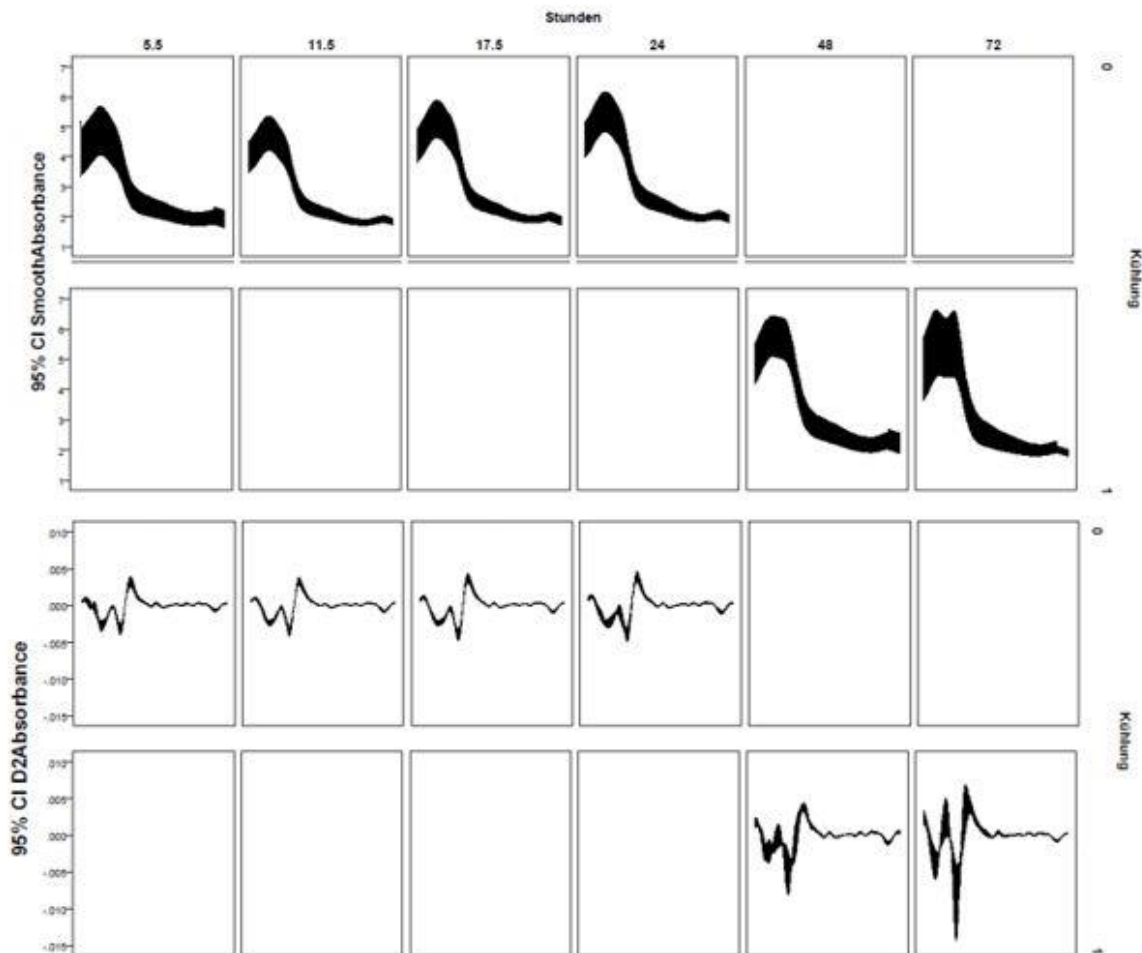


Auch bei den Minima (Abbildung 17) fanden sehr unterschiedliche Streuungen (m1, m2, m3, m4). Die Mediane zeigten sich innerhalb der ersten 24 Stunden stabil (m1, m3), beziehungsweise mit nur minimalen Änderungen (m2, m4). Ab 48 Stunden (m2), beziehungsweise ab 72 Stunden (m1, m3) gab es eine Linksverschiebung der Mediane. Beim Minimum m4 war dies nicht klar ersichtlich, hier änderte sich die Lokalisation des Medians im zeitlichen Verlauf kaum. Die Skalierung der Y-Achse in Abbildung 17a (Minimum m1) unterscheidet sich aufgrund der höheren Streuung, was bei der Analyse zu beachten ist.



**Abbildung 17: Minima m1 (a), m2 (b), m3 (c), m4 (d), Boxplots der Lokalisationen im zeitlichen Verlauf, X-Achse: Zeitpunkt [h post mortem], Y-Achse: Wellenlängen [nm]**

Bei Darstellung der Morphologie aller gültigen Spektren im zeitlichen Verlauf und deren zweiter Ableitung ergab sich folgendes Bild (95% Konfidenzintervall):



**Abbildung 18:** Darstellung aller Spektren gleicher Messzeitpunkte, x-Achse Wellenlänge  $\lambda$ , Y-Achse 95% Konfidenzintervall der Intensität (obere zwei reihen Absorbance, untere zwei Reihen d2A), aufgetragen gegen die Kühlung (0=nein; 1=ja)

Es zeigte sich, dass innerhalb der ersten 24 Stunden sowohl in Bezug auf die Lokalisation der Peaks und Dips als auch auf die Intensität kaum Veränderung stattfand. Dies ändert sich nach Überführen der Körper in die kältere Umgebung. Bei 48 Stunden entwickelte sich im VIS-Bereich bei dem vormaligen einzelnen Maximum ein Plateau, welches sich langsam zu zwei Maxima und einem dazwischenliegenden Minimum entwickelte und sich somit dem Referenzspektrum von oxygeniertem Hämoglobin annäherte (vergleiche auch hierzu Abbildung 8). Analog dazu fand sich in der zweiten Ableitung der Absorbance in den ersten 24 Stunden kaum Veränderung, ab 48 Stunden näherte sich die Morphologie der 2. Ableitung des Referenzspektrums für HbO<sub>2</sub> an (vergleiche Abbildung 9). Die Veränderung der Spektren nach Kälteexposition wird in Kapitel 4.1.3 Verhalten der Leichenfleckfarbe und der dazugehörigen Spektren nach 48h und 72h post mortem näher untersucht.

#### **4.1.2 Die Hämoglobinderivate im zeitlichen Verlauf**

Für die folgende Auswertung wurden die Messzeitpunkte innerhalb der ersten 24 Stunden berücksichtigt, da ab 36 Stunden eine Kühlung der Körper erfolgte und somit für die weiteren Messungen andere Umgebungsfaktoren vorherrschten. Da nicht bei allen Verstorbenen eine frühe 5,5h-Messung durchgeführt werden konnte, wurde der Datensatz geteilt. Es wurden alle Fälle mit 5,5h und alle Fälle mit 11,5h als frühesten Messzeitpunkt getrennt ausgewertet und die Werte normalisiert, also die Änderung der einzelnen Hämoglobinderivate eines einzelnen Falles im Vergleich zum Ausgangswert berechnet, um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Individuen herzustellen. Es wird jeweils der Änderungsfaktor im Vergleich zum frühesten Messwert dargestellt.

11 Fälle wurden für diese Untersuchung im zeitlichen Verlauf aufgrund von Softwareproblemen und fehlender, nicht ausgegebener Prozentwerte ausgeschlossen. In die folgende Auswertung gingen somit 26 Fälle mit insgesamt 66 Messungen ein. Eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Anteile der Hämoglobinderivate ließ sich mithilfe des Spektrometers nicht treffen.

##### Reduziertes Hämoglobin (RHb)

Bei den meisten Fällen lag der Anteil des RHbs zu Beginn der Messungen in hohen Bereichen (ausgegebene Werte zwischen 80 und 100%).

Abbildung 19 zeigt die Änderung des RHbs, normalisiert auf die 5,5h-Messungen im zeitlichen Verlauf.

Bei keinem Fall stieg innerhalb der ersten 24 Stunden das RHb kontinuierlich an, wohingegen es bei drei Fällen (8,17 und 27) im Verlauf sank. Bei fünf Fällen stieg es erst an, um dann wieder abzusinken (12,16, 26, 28, 29). Bei vier Fällen blieb es erst konstant, sank dann später aber ab (4, 6, 14,19) und bei zweien sank es erst und blieb dann konstant (9,11).

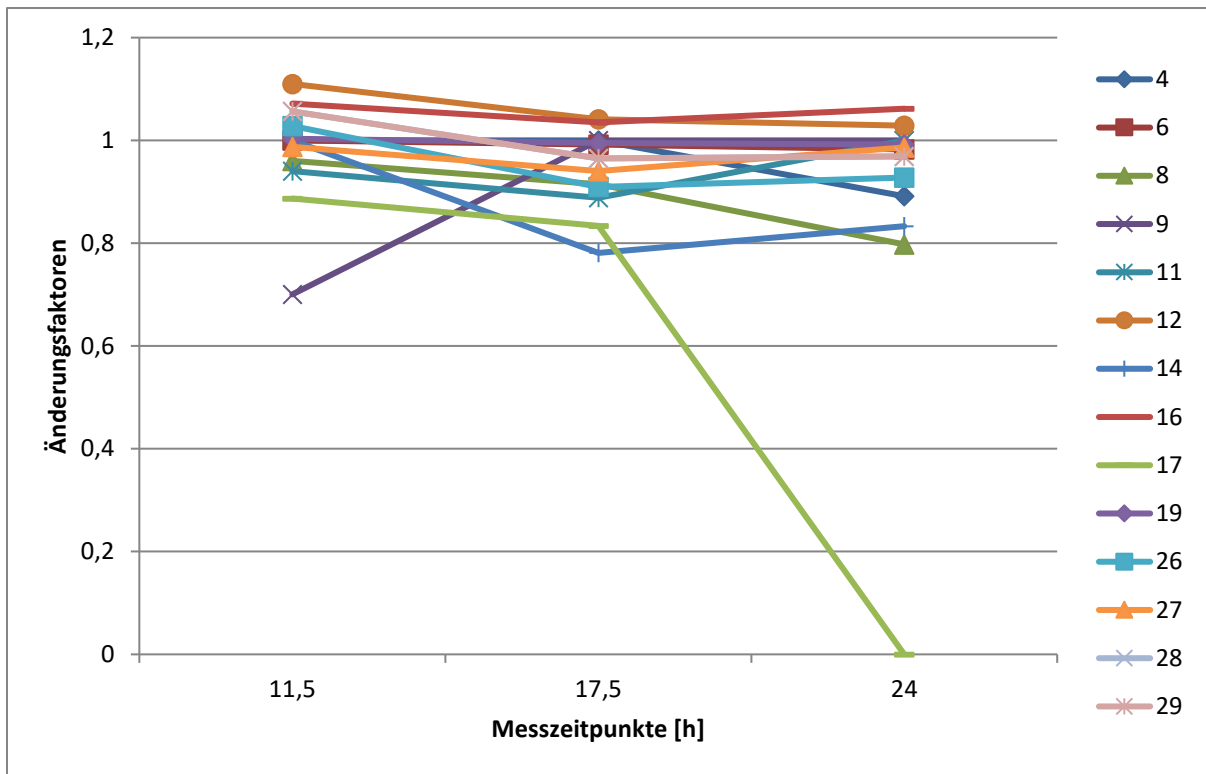
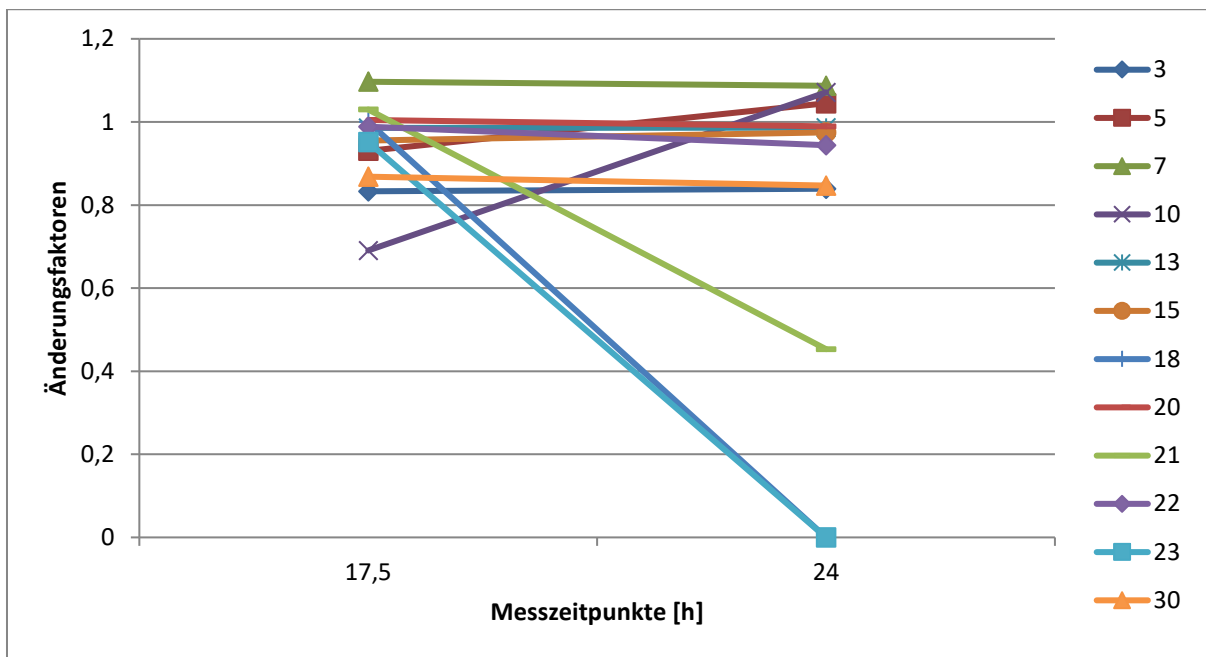


Abbildung 19: Änderung des RHbs im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h-Messung

Auf Abbildung 20 sind die Verläufe des RHbs der Fälle mit 11,5h-Messung als frühester Messung dargestellt. Die Beschriftung erfolgte wie auf Abbildung 19, normalisiert wurde hier auf die 11,5h-Messungen.

Auch hier stieg das RHb in keinem der Fälle, wohingegen es bei dreien kontinuierlich abfiel (22, 23, 30). Bei zweien blieb der Wert nahezu konstant (13,20). Bei einem Fall stieg das RHb erst an, um dann abzusinken (21), und bei dreien fiel es erst ab und stieg dann wieder an (5, 10, 15). Bei einem Fall stieg das RHb erst an und blieb danach konstant (7) und bei einem anderen sank es erst und blieb dann konstant (3).



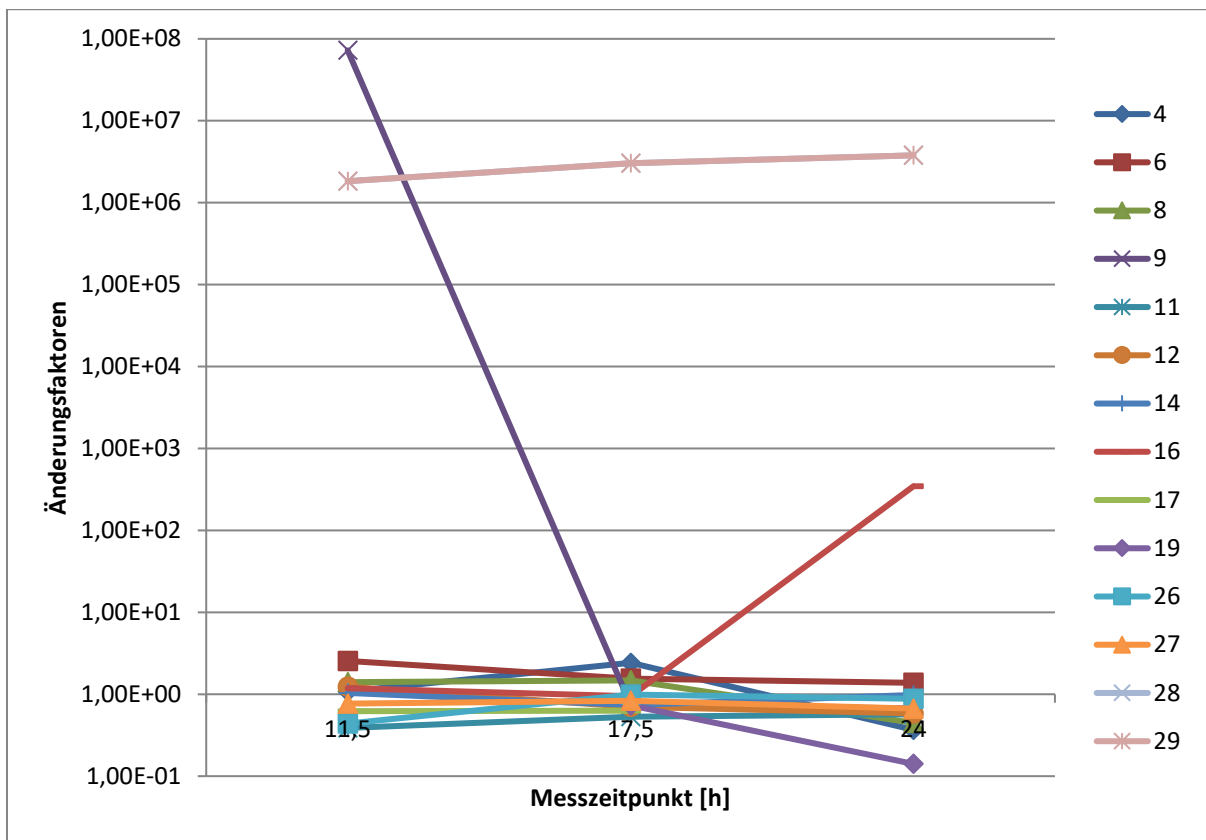
**Abbildung 20: Änderung des RHbs im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 11,5h-Messung**

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bei den 26 Verstorbenen keine klare Tendenz im Verlauf des RHbs innerhalb der ersten 24 Stunden post mortem erkennbar ist.

### Oxygeniertes Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>)

Bezüglich des HbO<sub>2</sub> bewegten sich die gemessenen Prozentwerte in den ersten 24 Stunden fast durchweg in sehr kleinen Bereichen von negativen Zehnerpotenzen. Eine Änderung um wenige negative Zehnerpotenzen bewirkte in der graphischen Darstellung einen Anstieg oder ein Absinken um den Faktor Tausend oder mehr. Daher wurde hier eine logarithmische Darstellung der Werte gewählt.

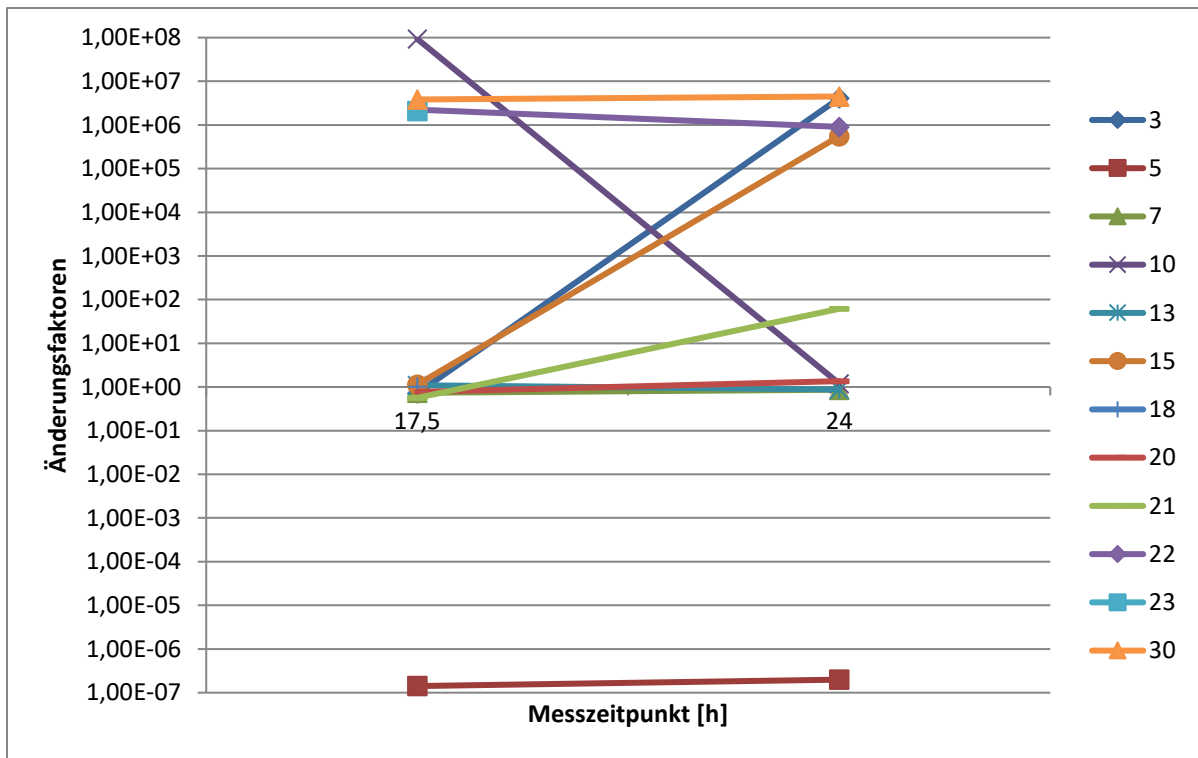
Abbildung 21 zeigt die Änderung des HbO<sub>2</sub>, normalisiert auf die 5,5h-Messung in Prozent im zeitlichen Verlauf. Bei jeweils zwei Fällen stieg das HbO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf an (28, 29), beziehungsweise sank ab (11, 19). Bei fünf Fällen stieg das HbO<sub>2</sub> zunächst an, um später wieder abzusinken (4, 6, 8, 9, 12).



**Abbildung 21: Änderung des HbO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 5,5h-Messungen, logarithmische Darstellung**

Bei einem Fall blieb es erst konstant und sank dann (14), bei einem anderen Fall sank es zunächst und blieb danach konstant (17). Bei drei Fällen stieg das HbO<sub>2</sub> erst an, sank dann leicht ab und stieg danach noch einmal an (19, 26, 27), und bei einem Fall stieg es erst, sank dann ab und stieg noch einmal an (16).

Auf Abbildung 22 sind die Verläufe des HbO<sub>2</sub> der Fälle mit 11,5h-Messung als frühester Messung dargestellt. Die Beschriftung erfolgte wie auf Abbildung 21, normalisiert wurde hier auf die 11,5h-Messungen. Bei einem der Fälle sank das HbO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf ab (5), in drei Fällen stieg es jedoch an (15, 23, 30) und bei einem Verstorbenen fand keine Änderung statt (18). In vier Fällen stieg das HbO<sub>2</sub> zunächst an und fiel dann wieder ab (3, 7, 20, 21) und in drei Fällen sank es erst ab, um dann wieder anzusteigen (10,13, 22).



**Abbildung 22: Änderung des HbO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 11,5h-Messungen, logarithmische Darstellung**

Auch im Verlauf des HbO<sub>2</sub> lässt sich innerhalb der ersten 24 Stunden keine Tendenz feststellen.

### Methämoglobin (MetHb)

Die Messwerte des MetHb lagen sowohl in sehr kleinen Bereichen von negativen Zehnerpotenzen als auch in Bereichen mehrerer Prozente, sodass für die Graphik eine logarithmische Darstellung der Werte gewählt wurde. Abbildung 23 zeigt die zeitliche Änderung des MetHb, normiert auf die 5,5h-Messungen. Rechts abgebildet sind die Fallnummern. In fünf Fällen (4, 6, 8, 12, 17) stieg das MetHb im Verlauf der ersten 24 Stunden an, bei keinem Fall blieb es konstant oder sank. Bei vier Verstorbenen (9, 11, 14, 27) kam es zunächst zu einem Anstieg und später zu einem Absinken des MetHbs. In zwei Fällen fiel das MetHb erst ab und stieg später wieder an (28, 29) und bei drei Verstorbenen (16, 19, 26) fand sich zuerst ein Abfall, dann ein Anstieg und schließlich wieder ein Abfall des MetHbs.

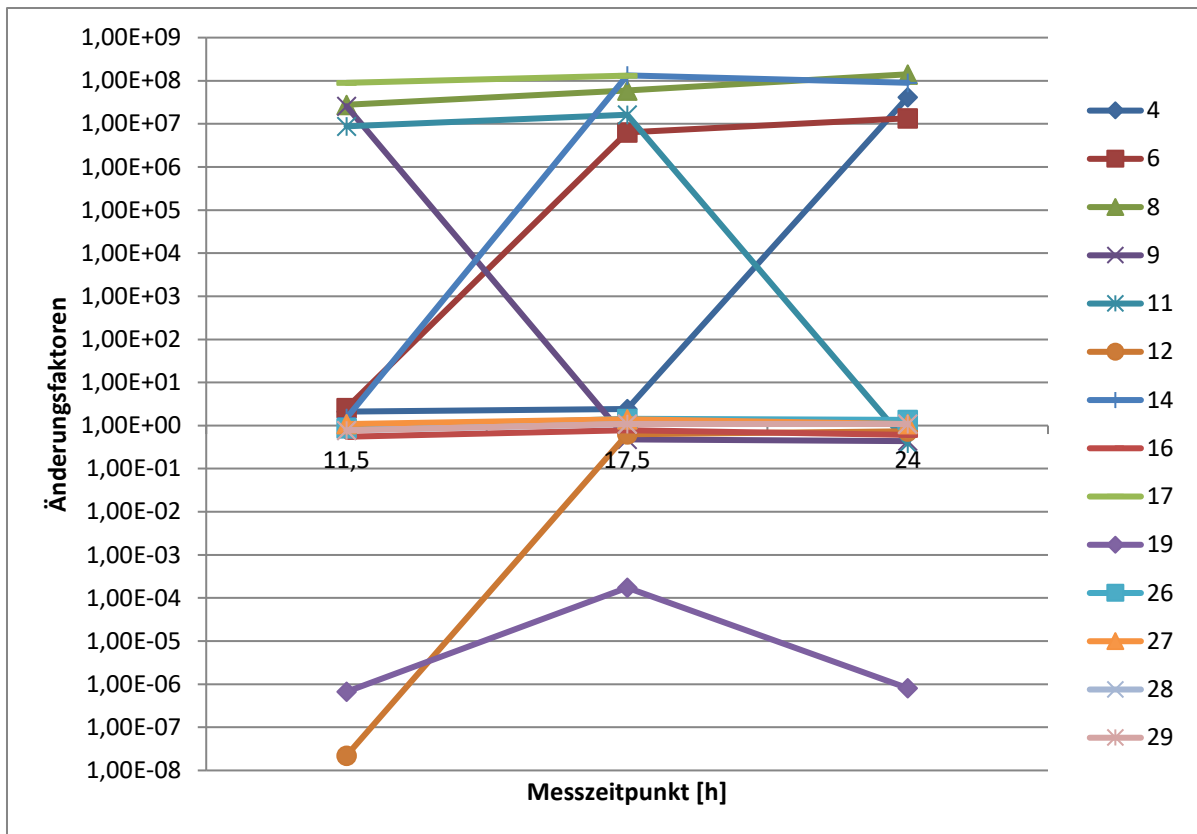
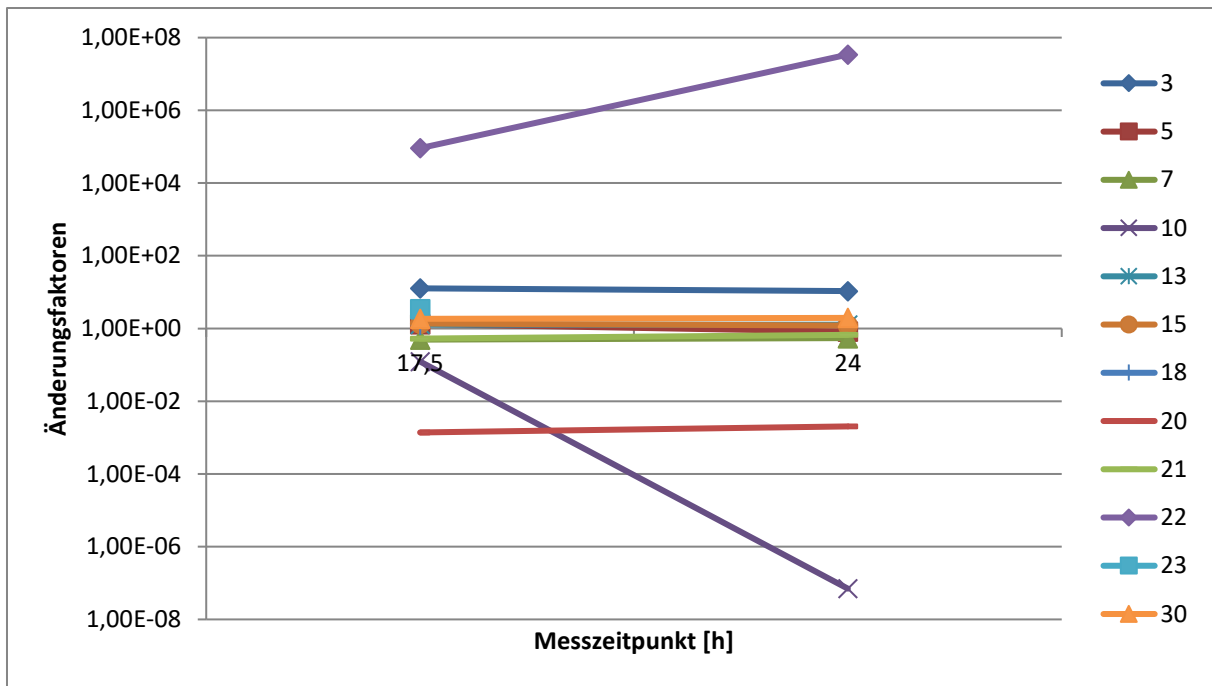


Abbildung 23: Änderung des MetHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h-Messung, logarithmische Darstellung

Abbildung 24 zeigt die zeitliche Änderung des MetHbs, normalisiert auf die 11,5h-Messungen. Die Beschriftung erfolgte auch hier wie oben erläutert.

In vier Fällen stieg das MetHb im Verlauf an (18, 22, 23, 30) und in einem sank es ab (10). Bei drei Leichen (3, 5, 15) kam es erst zu einem Anstieg und danach zu einem Abfall, und bei ebenfalls drei Verstorbenen (7, 30, 21) wiederum erst zu einem Abfall und dann zu einem Anstieg. Bei einem Fall stieg das MetHb zunächst an und blieb dann konstant (13).





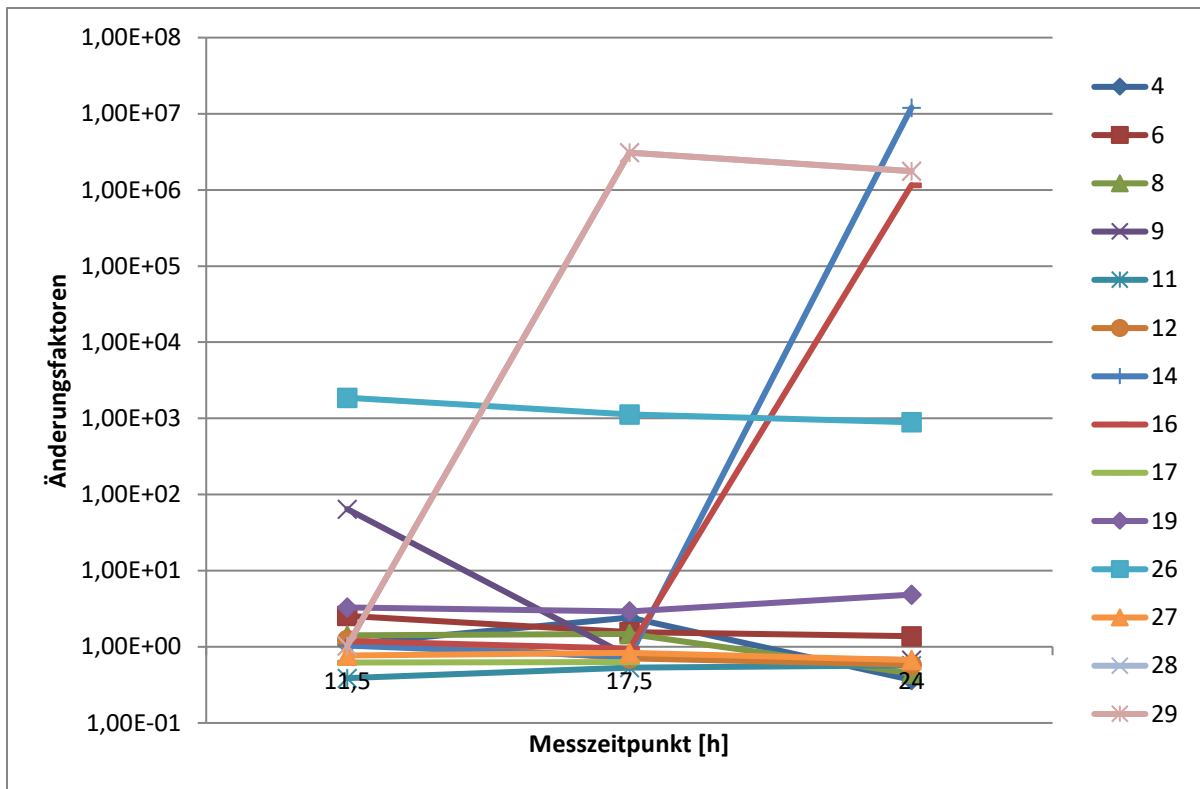
**Abbildung 24: Änderung des MetHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 11,5h-Messung, logarithmische Darstellung**

Zusammengefasst lässt sich bei den 26 untersuchten Fällen keine klare Tendenz für das MetHb in den ersten 24 Stunden post mortem feststellen.

### Carboxyhämoglobin (COHb)

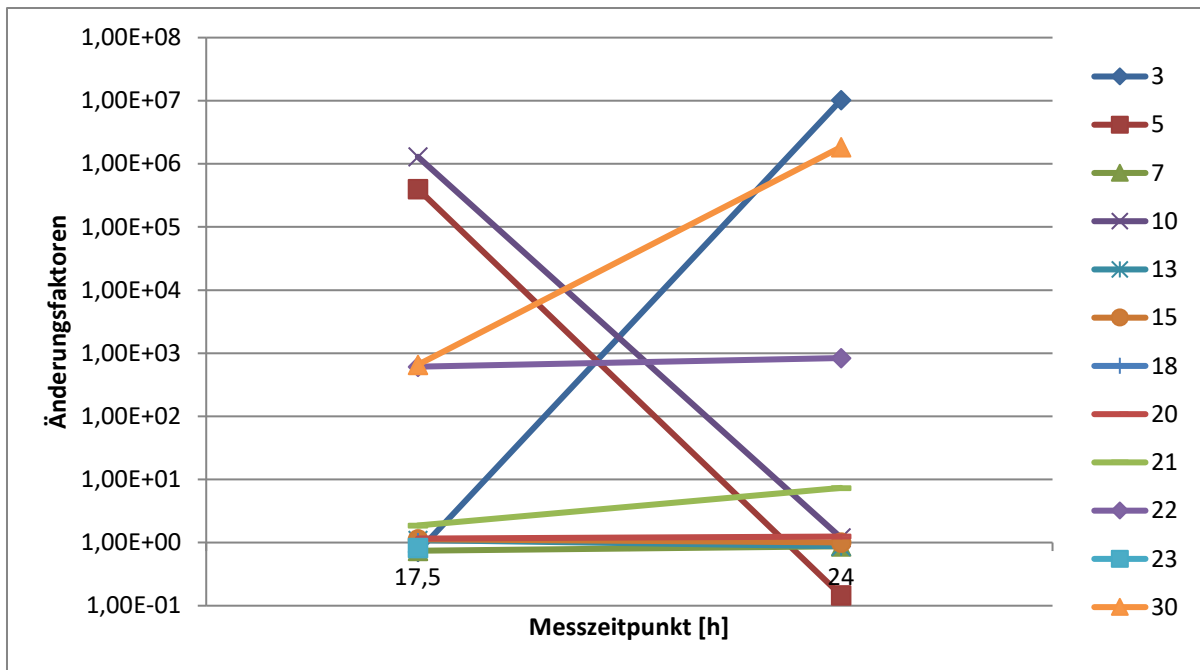
Außer in einem Fall (19) lag das COHb bei sehr niedrigen Werten um  $10^{-7}\%$  oder weniger, also quasi bei 0%. Dieser Aspekt ist bei der Betrachtung der Werte zu berücksichtigen. Es wurde ebenfalls eine logarithmierte Darstellung der Werte gewählt.

Abbildung 25 zeigt den zeitlichen Verlauf des COHb auf die 5,5h Messungen normalisiert. In keinem der Fälle stieg das COHb durchgehend an, blieb gleich oder fiel ab. In sechs Fällen (4, 6, 8, 9, 12, 26) stieg es erst an und fiel dann im Verlauf wieder ab und in zwei Fällen (11, 17) fiel es erst ab, um dann wieder anzusteigen. In einem Fall (14) blieb es gleich, fiel dann ab und stieg dann wieder an; in zwei Fällen (16, 19) stieg es an, sank dann wieder ab und stieg dann wieder. In einem weiteren Fall (27) fiel es zunächst ab, stieg dann wieder an, um schließlich wieder abzufallen.



**Abbildung 25: Änderung des COHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf 5,5h-Messungen, logarithmische Darstellung**

Abbildung 26 zeigt die zeitliche Änderung des COHbs, normalisiert auf die 11,5h-Messungen. Die Beschriftung erfolgte auch hier wie oben beschrieben. In sechs Fällen stieg das COHb im Verlauf an (3, 10, 20, 21, 22, 30) und in einem sank es ab (23), bei einem blieb es konstant (18). Bei zwei Leichen (5, 13) kam es erst zu einem Anstieg und danach zu einem Abfall, und bei einem Verstorbenen (7) wiederum erst zu einem Abfall und dann zu einem Anstieg. Bei einem Fall stieg das COHb zunächst an und blieb dann konstant (15).

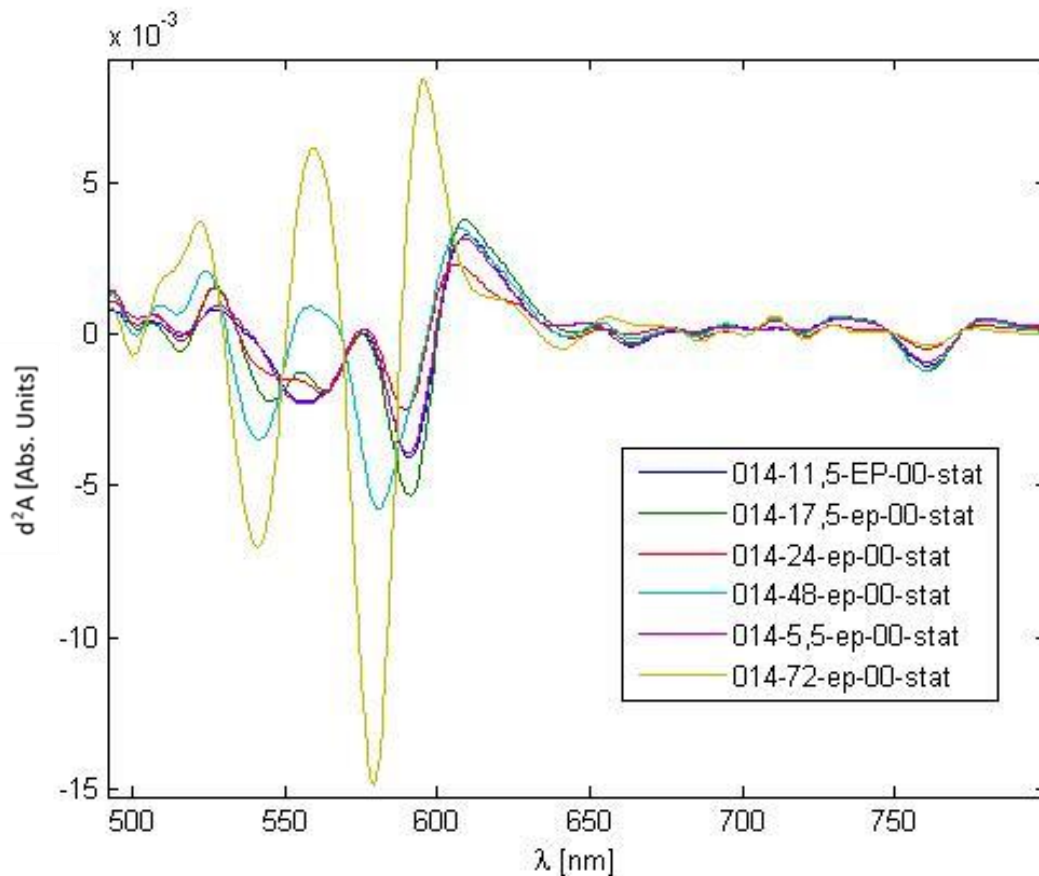


**Abbildung 26: Änderung des COHb im zeitlichen Verlauf, normalisiert auf die 11,5h-Messungen, logarithmische Darstellung**

Zusammengefasst lässt sich für den postmortalen Verlauf des COHb-Anteils der Leichenflecken in den 26 Fällen keine Tendenz feststellen.

#### **4.1.3 Verhalten der Leichenfleckfarbe und der dazugehörigen Spektren nach 48h und 72h post mortem**

Zusätzlich zu den spektrophotometrischen Messungen wurde zu jedem Zeitpunkt die sichtbare Leichenfleckfarbe dokumentiert. Hier wurde zwischen blau-livide, braunrot, rötlich-livide (Mischbild aus hellroten Leichenflecken mit lividen Anteilen) und homogen hellrot unterschieden. Da die Verstorbenen nach 36 Stunden post mortem in einen Raum mit einer Umgebungstemperatur von etwa 12 °C gebracht wurden, fanden die Messungen nach 48 und 72 Stunden bei einer kälteren Umgebungstemperatur statt. Hierbei kam es in einigen Fällen zu einer morphologischen Veränderung der Spektren im Sinne einer Linksverschiebung in Richtung des HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrums. Dies wurde als Zeichen einer Kältereoxygenierung gewertet (beispielhaft Fall 14, Abbildung 27).



**Abbildung 27: Übersicht aller Spektren von Fall 14; die hellblaue Kurve repräsentiert die 48h-Messung, die ockerfarbene Kurve die 72h-Messung.**

Insgesamt fanden sich bei 142 Messungen blau-livide Leichenflecken, davon wurde bei nur einer Messung (Fall 21) spektrophotometrisch eine Linksverschiebung festgestellt (0,7%). Bei 30 Messungen lagen rötlich-livide Leichenflecken vor (diese allesamt bei 48 Stunden oder 72 Stunden), hier zeigte sich in 15 Fällen eine Linksverschiebung (50%). Bei vier Messungen waren die Leichenflecken auffällig hellrot (immer bei 72 Stunden), hier zeigte sich dreimal eine Reoxygenierung (75%). Tabelle 2 veranschaulicht diese Ergebnisse.

**Tabelle 2: Anzahl der Messungen in Bezug auf Farbe, Zeitpunkt und Vorhandensein einer spektrophotometrischen Linksverschiebung**

		Farbe							
		blau-livide		rötlich-livide		hellrot		braunrot	
		Linksverschiebung		Linksverschiebung		Linksverschiebung		Linksverschiebung	
		nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja
postmortale Zeit [h]	5,5h	22	0	0	0	0	0	0	0
	11,5h	37	0	0	0	0	0	0	0
	17,5h	37	0	0	0	0	0	0	0
	24h	32	1	0	0	0	0	0	0
	48h	12	0	9	9	0	0	0	0
	72h	1	0	6	6	1	3	0	0
<b>Gesamt</b>		<b>141</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Gesamtmessungen: 176</b>		<b>142</b>		<b>30</b>		<b>4</b>		<b>0</b>	

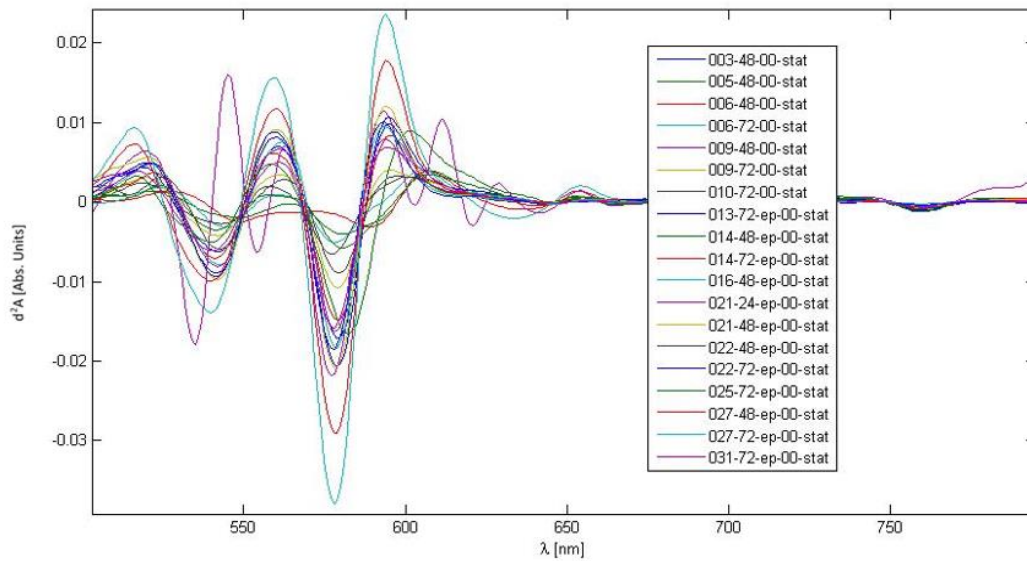
Unter Annahme einer Nullhypothese ( $H_0$ : „Es besteht kein Zusammenhang zwischen makroskopisch rötlich-lividen oder hellroten Leichenflecken und spektrophotometrisch sichtbarer Linksverschiebung“) wurde ein Exakter Test nach Fisher durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  betrug der P-Wert  $<.0005$ . Somit konnte die Nullhypothese verworfen und ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Für die Testgüte des Spektrometers ergab sich eine Spezifität von 0,993 und eine Sensitivität von 0,529. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Anzahl der Fälle mit Linksverschiebung nach Messzeitpunkten.

Unter Einbezug des Falles 021 lagen insgesamt 19 Spektren mit Linksverschiebung vor. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Lage der Extrema aller Spektren von Fällen mit Linksverschiebung. Die Lokalisation auf der Abszisse ist in Nanometer angegeben. Durch Betrachten der Histogramme für die Werte der Peaks wurde festgestellt, dass bei zwei der acht Peaks (M2 und m1) eine Normalverteilung der Werte vorlag. Die Werte für die restlichen sechs Peaks waren demnach nicht normalverteilt. Daher wurde im Folgenden mit den Medianen gearbeitet. Es fällt auf, dass die Werte der Extrema sich deutlich dem HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrum annähern.

**Tabelle 3: Lage der Extrema bei Fällen mit Linksverschiebung [nm] und Referenzwerte des HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrums (leere Felder = kein Peak vorhanden)**

Fall	h pm	M2	M3	M4	M5	m1	m2	m3	m4
3	48	519	561	595	654	499	542	579	761
5	48	522	564	608	654	504	549	580	761
6	48	527	572	607	654	510	549	589	761
	72	524	561	605	654	504	544	578	761
9	48	520	563	611	654	500	554	577	761
	72	520	561	595	654	499	542	579	761
10	72	519	563	598	653	494	543	579	761
13	72	520	560	595	655	501	542	579	760
14	48	524	558	607	653	515	541	581	760
	72	522	559	595	656	500	541	579	761
16	48	521	562	593			542	579	
21	24	522	561	594		502	542	578	761
	48	520	560	594		502	542	578	761
22	48	525	558	601		515	542	577	760
	72	521	560	593		501	542	578	
25	72	517	559	602	657	494	540	582	
27	48	516	560	594		475	578		
	72	516	559	594		475	578		
31	72	517	561	594	656	496	540	578	759
<b>Median:</b>		<b>520</b>	<b>561</b>	<b>595</b>	<b>654</b>	<b>505</b>	<b>542</b>	<b>579</b>	<b>761</b>
<b>Referenzwert HbO<sub>2</sub>:</b>		<b>521</b>	<b>563</b>	<b>591</b>			<b>542</b>	<b>578</b>	
Referenzwert RHB:		495	532	577	604	511	553	589	759

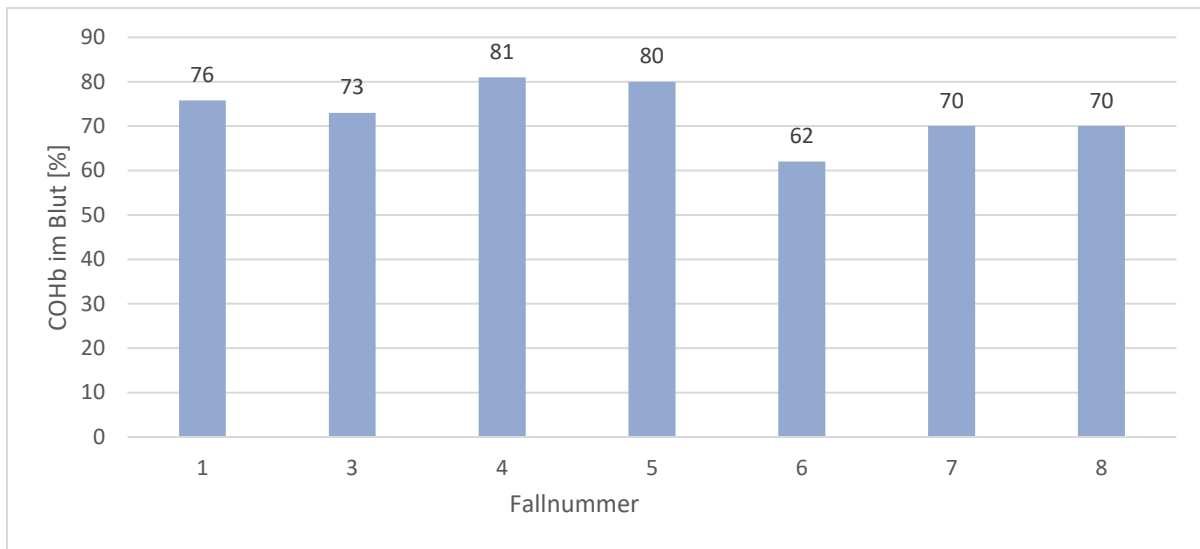
Abbildung 28 zeigt eine Übersicht aller Spektren mit Linksverschiebung. Erkennbar ist eine deutliche morphologische Annäherung an das HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrum. Weiter fällt auf, dass das Minimum m4, welches der spezifischen Absorptionsbande von reduziertem, sauerstofffreiem Hämoglobin entspricht, bei einem Großteil der Spektren mit Kältereoxygenierung nur noch sehr schwach ausgeprägt ist oder ganz fehlt.



**Abbildung 28: Übersicht aller Spektren mit Linksverschiebung**

## 4.2 Kohlenmonoxid-Messreihe

Die Messungen wurden an acht Verstorbenen mit Verdacht auf Kohlenmonoxidintoxikation durchgeführt. Bei einem Fall konnte der Anfangsverdacht toxikologisch widerlegt werden, sodass die Daten von sieben Verstorbenen in die Endauswertung mit einbezogen wurden. Von den sieben Leichnamen waren sechs männlich (85,7 %) und einer weiblich (14,3%). Der jüngste Verstorbene war 30 Jahre, die älteste Verstorbene 83 Jahre alt geworden, der Median lag bei 57 Jahren. Abbildung 29 zeigt eine Übersicht der toxikologisch gemessenen COHb-Werte in Prozent im Blut der Verstorbenen.



**Abbildung 29: COHb-Gehalt im Blut [%] der Verstorbenen, Kohlenmonoxid-Messreihe**

#### **4.2.1 Lage der Extrema der Kohlenmonoxidmessreihe**

Die Messungen erfolgten direkt nach Eintreffen der Leichen im Institut für Rechtsmedizin. Schon bei der Aufzeichnung der Spektren fiel deren Morphologie auf. Bei allen Fällen mit Kohlenmonoxidintoxikation war eine große Ähnlichkeit mit dem COHb-Referenzspektrum auszumachen, somit zeigten alle sieben Spektren jeweils drei Maxima und zwei Minima (Abbildung 30).



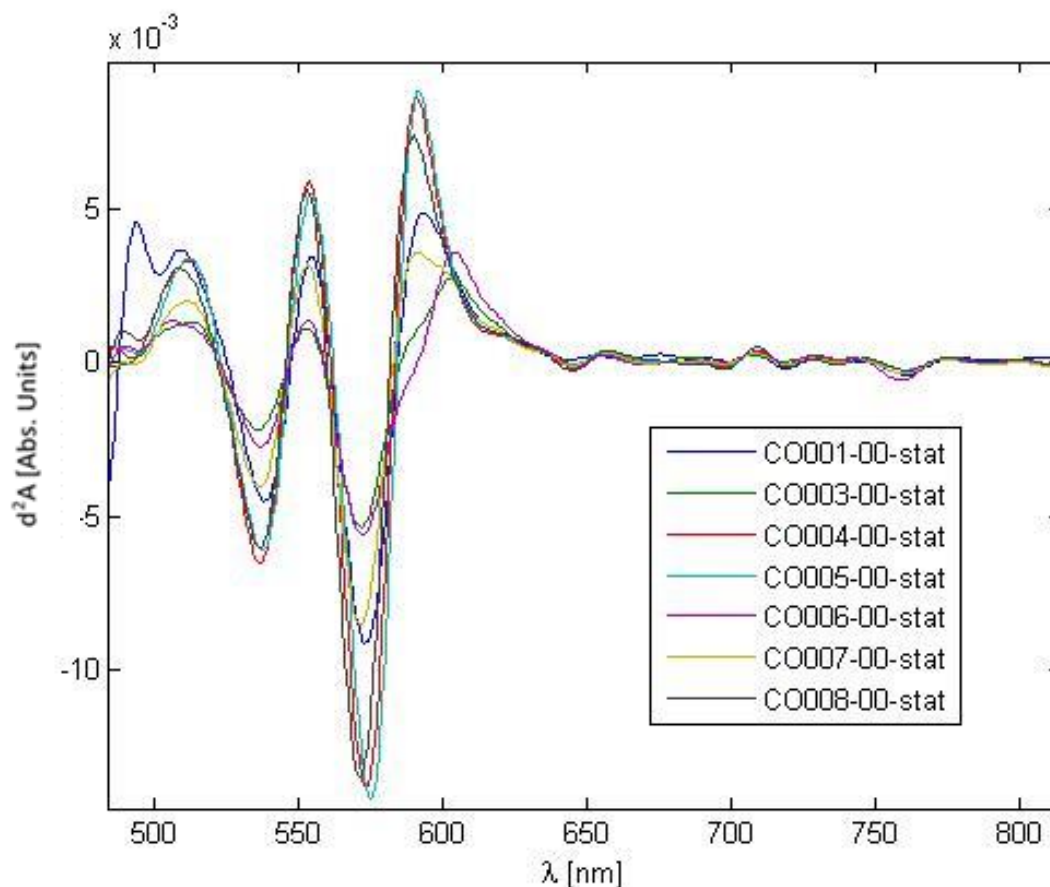


Abbildung 30: Übersicht aller Fälle mit CO-Vergiftung, zweite Ableitung der Absorbance

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Lokalisation der Extrema auf der X-Achse in Nanometer, den dazugehörigen Median und die Referenzwerte des COHb-Spektrums.

Tabelle 4: Lokalisation [nm] der Extrema bei den Spektren der CO-Fälle mit Referenzwerten

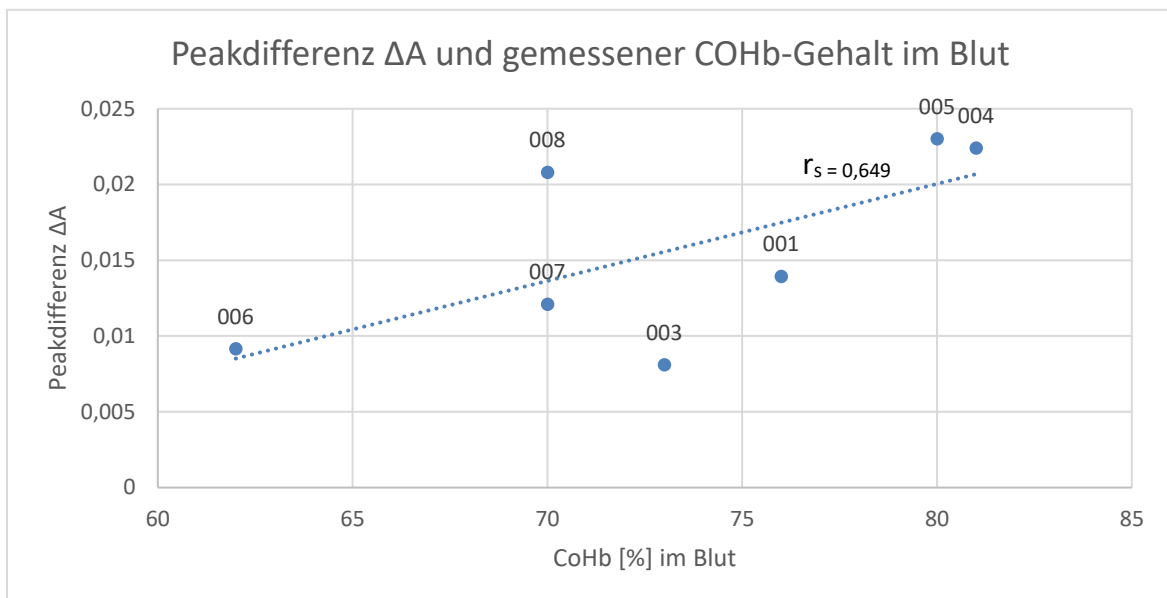
CO-Fall	M2 <sub>co</sub>	M3 <sub>co</sub>	M4 <sub>co</sub>	m2 <sub>co</sub>	m3 <sub>co</sub>
CO-Fall 001	509	554	593	538	573
CO-Fall 003	513	553	604	536	572
CO-Fall 004	512	554	591	537	573
CO-Fall 005	512	554	592	537	575
CO-Fall 006	506	553	604	537	572
CO-Fall 007	511	553	591	536	572
CO-Fall 008	509	553	590	537	571
Median	511	553	592	537	572
Referenz	516	555	587	538	571

Es zeigte sich, dass die Mediane der Peaks deutlich den Referenzwerten des Carboxyhämoglobins ähnelten, die größte Abweichung fand sich bei M2<sub>co</sub> und M4<sub>co</sub> (5nm), die geringste bei den Minima m2<sub>co</sub> und m3<sub>co</sub> (1nm).

#### 4.2.2 Intensität der Spektren und Konzentration im Blut

Um zu prüfen, ob die Intensität der Spektren mit den in der toxikologischen Untersuchung ermittelten Blutkonzentrationen von COHb korrelierte, wurde die Peakdifferenz  $\Delta A$  zwischen Minimum m3CO und dem Maximum M4CO gemessen. Es galt die Annahme, dass die Intensität der Spektren, beziehungsweise die Amplitude der Extrema mit steigendem COHb-Gehalt zunimmt.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, lagen die im Herzblut gemessenen COHb-Werte zwischen 62% und 81%. Die niedrigste Konzentration wies Fall 6 auf (62%), gefolgt von Fall 7 und 8 (je 70%), Fall 3 (73%), Fall 1 (76%), Fall 5 (80%) und Fall 4 mit der höchsten Konzentration (81%).



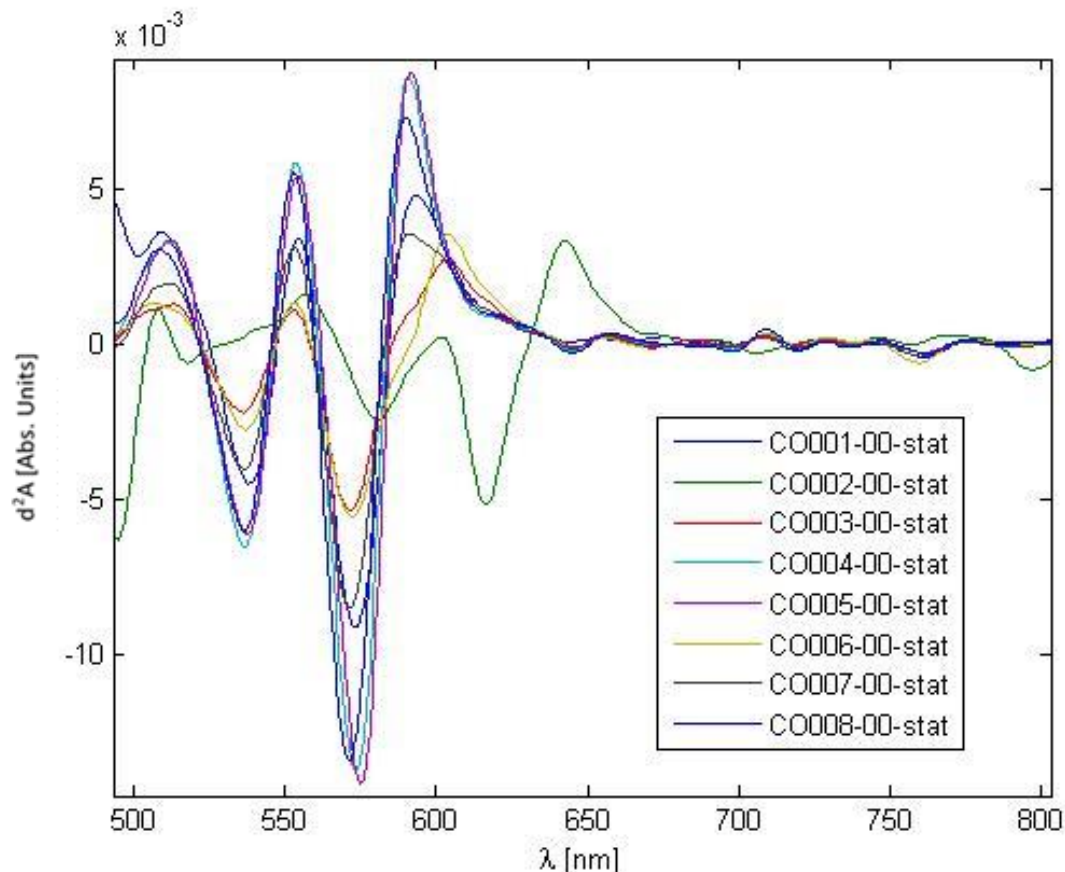
**Abbildung 31: Peakdifferenz  $\Delta A$  und CoHb-Gehalt [%] im Blut der Verstorbenen, Datenpunkte=Fallnummern,  $r_s$ =Spearman-Korrelationskoeffizient**

Nach Auflegen einer Trendlinie zeigte sich, dass bei steigenden COHb-Werten im Blut die Peakdifferenz tendenziell ebenfalls steigt. Der Spearman-Korrelationskoeffizient  $r_s$  wurde mit 0,649 berechnet ( $p = .115$ ).

#### 4.2.3 Vergleich mit nicht-bestätigtem Fall CO-002

Ein Fall der Messreihe wies keine erhöhten COHb-Werte im Blut auf und wurde daher von der restlichen Auswertung ausgeschlossen. Es handelte sich um eine weibliche, 67 Jahre alt gewordene Verstorbene (BMI 19,46 kg/m<sup>2</sup>) mit auffällig hellroten Leichenflecken, weswegen der Anfangsverdacht einer CO-Intoxikation gestellt wurde.

Abbildung 32 zeigt alle Spektren der an Kohlenmonoxidvergiftung Verstorbenen; der nicht bestätigte Fall CO-002 ist in der Farbe Grün dargestellt. Hier fällt auf, dass der Kurvenverlauf des Falls CO-002 stark von denen der anderen Spektren abweicht.  $M_2CO$  liegt hier bei 508 nm,  $M_3CO$  bei 557 nm und  $M_4CO$  bei 602 nm;  $m_2CO$  liegt bei 580 nm und  $m_3CO$  bei 616 nm. Weiterhin ist die Intensität an den Extrema insgesamt geringer als bei den gesicherten Kohlenmonoxidfällen.



**Abbildung 32: Spektren der CO-Messreihe, Fall CO-002 ist grün dargestellt**

Es findet sich weder eine Ähnlichkeit zum COHb noch zum HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrum (wie beispielsweise bei einer Reoxygenierung) oder zum RHb-Referenzspektrum. Einige der Peaks und Dips ähneln denen im Referenzspektrum des Methämoglobins, so findet sich in eben jenem ein Maximum bei 558 nm und ein doppelgipfliges Maximum bei 599 und 611 nm, sowie ein Minimum bei 580 nm. Die restlichen Peaks und Dips des MetHb-Referenzspektrums finden sich hingegen nicht im Spektrum von Fall CO-002 wieder.

### 4.3 Vergleich von Kohlenmonoxidintoxikation und Reoxygenierung

Wie schon eingangs erwähnt, fanden sich bei sieben der acht Verstorbenen mit hellroten Leichenflecken und Verdacht auf Kohlenmonoxidintoxikation erhöhte COHb-Werte im Blut. Bei der Hämoglobinderivatmessreihe trat bei insgesamt 13 Fällen eine Reoxygenierung mit Linksverschiebung der Spektren auf; bei einem Fall bereits nach 24 Stunden, bei acht Fällen nach 48 Stunden und bei vier Fällen nach 72 Stunden.

Abbildung 33 zeigt die Referenzspektren von COHb und HbO<sub>2</sub> im direkten Vergleich. Es fällt auf, dass die beiden Spektren sich grundsätzlich stark ähneln. Es gibt in beiden Fällen drei Maxima und zwei Minima, wobei die Extrema des COHb-Referenzspektrums auf der Abszisse etwas weiter links, d.h. bei kleineren Wellenlängen liegen.

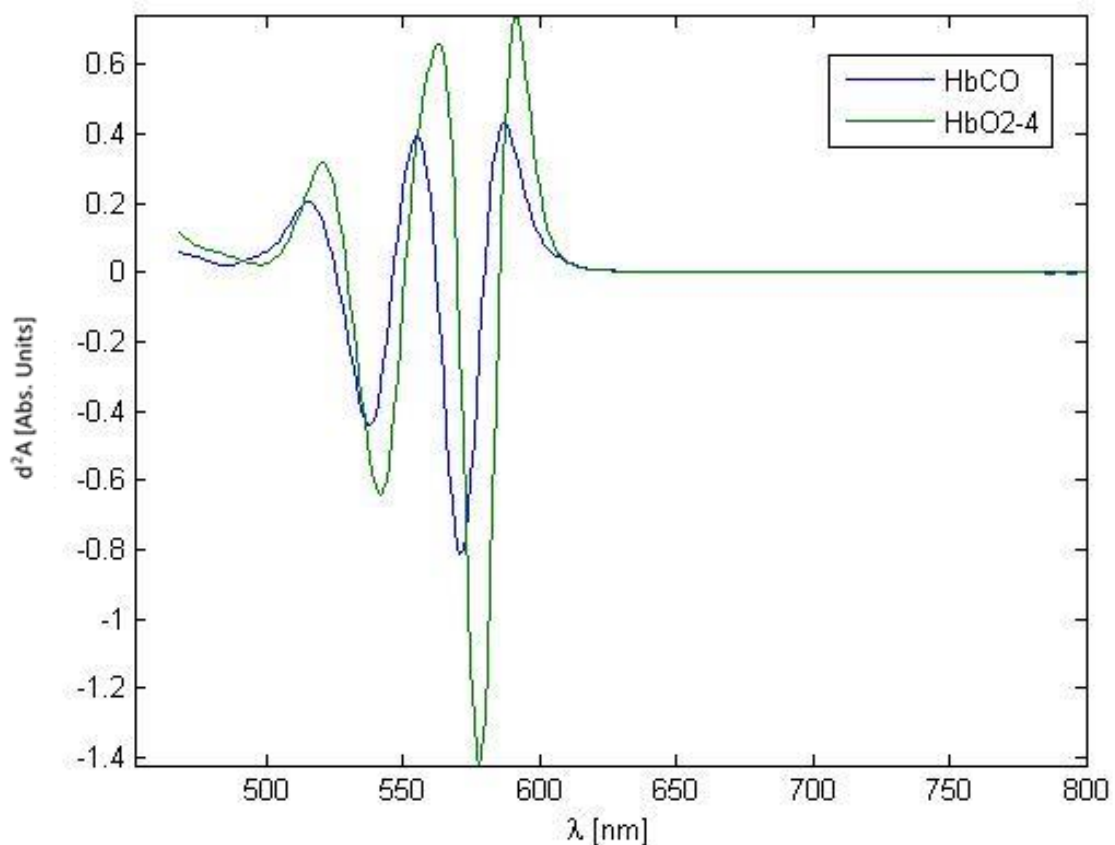
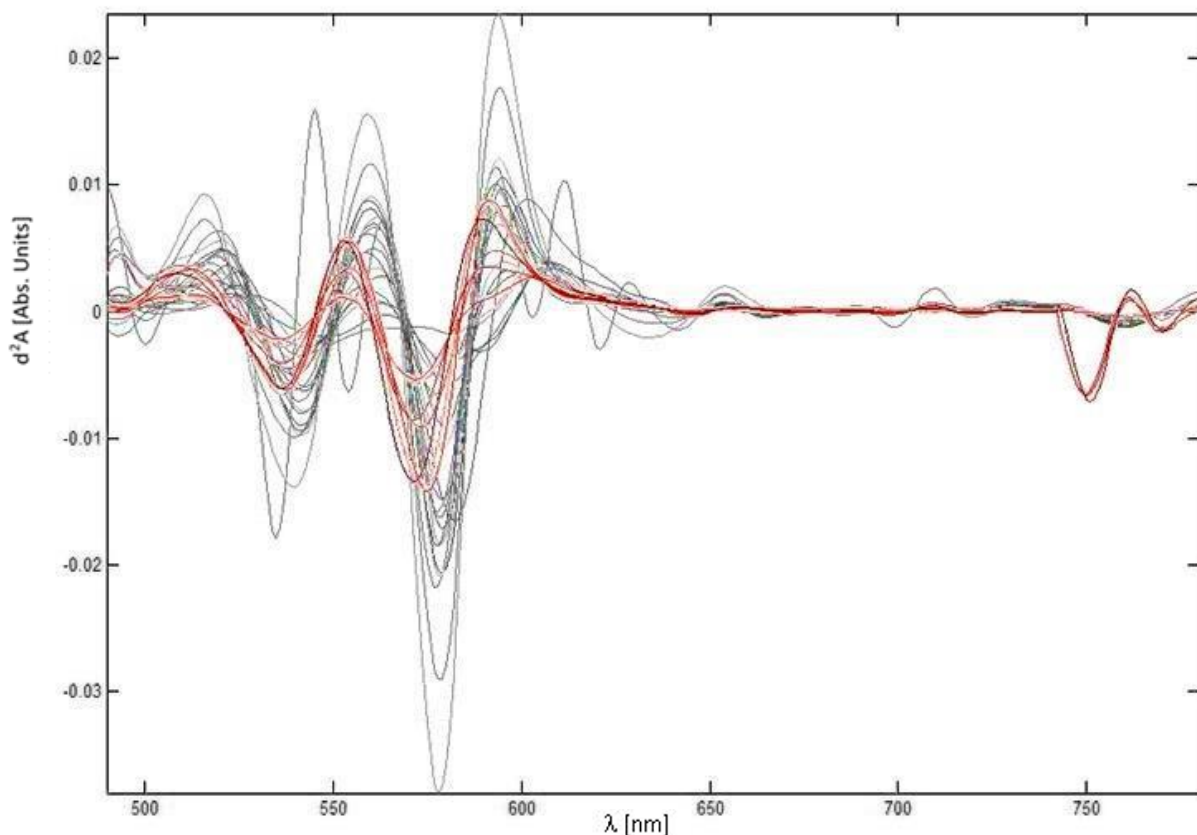


Abbildung 33: Referenzspektren von COHb (blau) und HbO<sub>2</sub> (grün)

Wurden nun die Lokalisation der Peaks und Dips aus Tabelle 3 mit denen aus Tabelle 4 verglichen, zeigte sich, dass die Werte der CO-Messreihe durchgängig weiter links auf der Abszisse lagen als die der linksverschobenen Spektren. Zusammengenommen passte dies zu den Referenzspektren und bestätigte, dass hier

bereits optisch ein Unterschied zwischen den Spektren an Kohlenmonoxid Verstorbenen und Verstorbenen mit hellroten Leichenflecken, welche durch Kälte hervorgerufen wurden, bestand.

Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 34 verdeutlicht, in der alle Spektren der CO-Messreihe (rot) und alle Spektren mit Linksverschiebung (schwarz) vergleichend dargestellt sind. Bereits optisch lagen die Spektren der CO-Verstorbenen im Schnitt weiter links auf der Abszisse. Auch war die Intensität der Spektren, welche von den Kohlenmonoxid-Verstorbenen stammen, insgesamt niedriger, was sich in einer geringeren Amplitude äußerte.



**Abbildung 34: Vergleich der Spektren mit Kältereoxygenierung (schwarz) und derjenigen von Verstorbenen mit CO-Intoxikation (rot)**

Eine Normalverteilung der Daten war nicht gegeben. Daher wurde ein Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test angewendet, um zu untersuchen, ob sich die gemessenen Werte für die Extrema signifikant voneinander unterscheiden. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden. Bei einem Signifikanzniveau von 5% zeigten sich folgende p-Werte (asymptotische Signifikanz) für die jeweiligen Peaks und Dips:

M2 und M2CO:  $p < .0005$

M3 und M3CO:  $p < .0005$

M4 und M4CO:  $p = .03$

m2 und m2CO:  $p < .0005$

m3 und m3CO:  $p = .01$

Die Nullhypothese konnte somit verworfen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisationen der jeweiligen Extrema beider Messreihen signifikant voneinander unterscheiden. Eine Differenzierung mithilfe des Geräts bei hohen COHb-Werten im Blut ist daher möglich.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methodik**

In der vorliegenden Studie wurden Leichenflecken frisch Verstorbener mithilfe von Reflexionsspektroskopie im VIS und NIR-Bereich und Anwendung von Derivativspektroskopie unter Bildung der zweiten Ableitung der Extinktionsspektren untersucht. Das Gerät erwies sich als klein, handlich und praktisch. Durch die glatte Oberfläche ließ es sich leicht und hygienisch reinigen. Die Durchführung der Messungen konnte mit jedem handelsüblichen Laptop mit Windows Betriebssystem, auf dem die Software installiert war und der über einen gewöhnlichen USB-Anschluss verfügte, erfolgen. Die Messungen an sich waren bereits nach kurzer Einführung des Nutzers in die Anwendung der Software durchführbar. Ein einzelner Messvorgang dauerte etwa fünf bis 10 Sekunden, sodass die Methode ohne viel Zeitaufwand anzuwenden war.

Die Kombination aus Reflexionsspektroskopie, Derivativspektroskopie mit Betrachtung der zweiten Ableitung und Ausweitung der untersuchten Wellenlängen auf den Nahinfrarot-Bereich ist bisher eine neue Methode. Es gab bereits mehrere Ansätze, mithilfe der Farbe und/oder Intensität der Leichenflecken die Todeszeit zu bestimmen. Geforscht wurde mit farbmtrischen Systemen, wie dem L\*a\*b-System (Vanezis 1991, Kaatsch et al. 1993a, 1993b, Vanezis und Trujillo 1996), oder RGB-Farbräumen und computergestützter Auswertung (Scholz 2014), mithilfe

spektrophotometrischer Messungen, beziehungsweise Reflexionsspektroskopie (Bohnert et al. 2005, 2008, Belenki et al. 2013), oder Kombinationen mehrerer dieser Methoden (Bohnert et al. 1999, Usumoto et al. 2010). Diese Methoden fanden auch in weiteren, ähnlichen Fragestellungen Anwendung. So prüfte Schäfer mithilfe des L\*a\*b-Systems die Entwicklung von Leichenblässe im zeitlichen Verlauf nach dem Tod und verglich die Hautfarbe mit der von lebenden Probanden (Schäfer 2000). Hughes und Langlois nutzen Reflexionsspektroskopie und Derivativspektroskopie mit Anwendung der ersten Ableitung und zogen zudem das CIE L\*a\*b System hinzu, um das Alter von Hämatomen am lebenden Probanden zu bestimmen (Hughes und Langlois 2010).

Um ein mathematisches Hautmodell zu umgehen, wurde in dieser Arbeit die zweite Ableitung der Absorbance zur Auswertung gewählt, um zu erwartende Streuungseffekte zu minimieren (Pingoud und Urbanke 1997) und den Einfluss der individuellen Hautfärbung zu minimieren (Hughes und Langlois 2010). Zudem wurde zur Normierung vor jeder Messung eine Kontrollmessung an einem benachbarten leichenfleckfreien Hautareal durchgeführt und somit die individuelle Hautgrundfarbe, welche verschiedenen Einflussfaktoren wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Melaningehalt oder Oberflächenbeschaffenheit unterliegt (Fullerton et al. 1996) subtrahiert. Dieses Normierungsverfahren wurde bereits mehrfach angewandt (Inoue et al. 1994, Smesny et al. 2001, Usumoto et al. 2010). Mithilfe der Software wurden unter Hinzunahme von Referenzspektren für humane Hämoglobinderivate Prozentwerte für die einzelnen Derivate errechnet, welche zusammen mit der Absorbance und der zweiten Ableitung der Absorbance für jede Wellenlänge in eine Exceldatei exportiert werden konnten. Die ausgegebenen Prozentwerte machten einen intraindividuellen Vergleich möglich, stellten jedoch keine absoluten Werte dar.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### *Hämoglobinderivat-Messreihe*

Zur Lage der Minima und Maxima und zur Intensität im zeitlichen Verlauf lässt sich sagen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden kein Muster erkennbar war. Nach Überführen der Leichname in eine kühlere Umgebungstemperatur kam es zu einer tendenziellen Verschiebung der Peaks nach links in Richtung kleinerer Wellenlängen und somit einer Annäherung an das HbO<sub>2</sub>-Referenzspektrum. Ansonsten waren die

Lagen der Peaks uneinheitlich. Insgesamt ließen sich durch die Lokalisationen der Peaks und Dips so keine Rückschlüsse auf die vergangene Zeit seit Eintritt des Todes feststellen, da diese keiner nachvollziehbaren Regelmäßigkeit unterlagen.

Wurden nun die berechneten Prozentwerte einzelner Hämoglobinderivate im zeitlichen Verlauf betrachtet, zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Sowohl in der Gruppe der Verstorbenen mit frühem ersten Messzeitpunkt bei 5,5 Stunden, als auch bei der zweiten Gruppe mit erstem Messzeitpunkt bei 11,5 Stunden ließen sich bei allen Verläufen der Hämoglobinderivate innerhalb der ersten 24 Stunden keine Regelmäßigkeiten erkennen.

Betrachtete man die Ausgangswerte von reduziertem Hämoglobin (RHb), also Hämoglobin ohne gebundene Sauerstoffmoleküle, lag der von der Software ausgegebene Ausgangswert in allen ausgewerteten Fällen bei relativ hohen Werten und machte somit den Großteil der vorhandenen Hämoglobinderivate aus. Da weithin bekannt ist, dass während des Sterbevorgangs die vorhandenen Sauerstoffreserven im Blut langsam verbraucht werden, und dieser Umstand zu blau-lividen Leichenflecken führt, war dies zu erwarten gewesen (Watchman et al. 2011). In nahezu allen Fällen lag das Carboxyhämoglobin (COHb) bei sehr niedrigen Werten um  $10^{-7}\%$  oder weniger, also quasi bei 0%. Hier ist die Bedeutung der Anstiege und Abfälle im Bereich von kleinsten Werten zu hinterfragen. Gleiches galt für die Werte von oxygeniertem Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>) innerhalb der ersten 24 Stunden, welche ebenfalls gegen Null gingen.

In einigen Fällen zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein deutlicher Anstieg von COHb, so beispielsweise bei den Fällen 03, 14, 16, 29 und 30. Die Frage nach COHb-Entstehung im Blut Verstorbenen wurde bereits eingehend untersucht; eine endogene signifikante postmortale COHb-Bildung konnte hierbei nicht festgestellt werden (Kojima et al. 1982, 1986, Payne-James und Robinson 2005). Es ist bekannt, dass bei erhöhtem Kohlenmonoxidgehalt der Raumluft CO durch die Haut diffundiert und bei Verstorbenen zur postmortalen COHb-Bildung in Leichenflecken führen kann (Hofmann und Haberda 1927, Sully et al. 2018). Im Rahmen dieser Messreihe ist nicht von einem erhöhten CO-Gehalt der Raumluft auszugehen, sodass diese theoretische Möglichkeit zu vernachlässigen ist.

Bei mehreren Fällen fanden sich Methämoglobinwerte innerhalb der ersten Messungen von um die hundert Prozent. Hierbei handelt es sich um Werte, welche



normalerweise selbst bei schwerer Intoxikation nicht auftreten, ein MetHb-Gehalt im Blut von 60-80% wird als sicher tödlich angesehen (Lüllmann et al. 2006).

Insgesamt betrachtet waren die ausgegebenen Werte für die Verläufe der Hämoglobinderivate von Fall zu Fall unterschiedlich und meist nicht plausibel; es konnten mit Hilfe des Geräts keine Tendenzen festgestellt werden. Somit können durch Betrachtung dieser Werte aktuell keine Rückschlüsse auf die Todeszeit gezogen werden.

Um den Einfluss von Kälteeinwirkung auf die Leichenflecken, den so genannten Reoxygenierungseffekt, zu untersuchen, wurden die Verstorbenen nach 36 Stunden in eine kühlere Umgebung verbracht und weiterhin die makroskopische Leichenfleckfarbe erfasst, sowie spektrophotometrische Messungen durchgeführt. Bis zum Messzeitpunkt nach 24 Stunden fanden sich ausschließlich blau-livide Leichenflecken. Ab 48 Stunden änderte sich bei einigen Verstorbenen die Färbung, sodass sich in insgesamt 30 Fällen rötlich-livide und ausschließlich ab 72 Stunden auch vier Mal hellrote Leichenflecken zeigten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es mithilfe des entwickelten Spektrometers möglich ist, diese Reoxygenierung durch morphologische Korrelate der Extinktionsspektren zu detektieren. 34 Messungen zeigten neu aufgetretene rötlich-livide oder hellrote Leichenflecken. In allen Fällen trat die makroskopische Farbveränderung bei 48 Stunden beziehungsweise bei 72 Stunden auf. Es fanden sich insgesamt 19 nach links verschobene Spektren, hiervon 18 bei makroskopisch rötlich-lividen oder hellroten Leichenflecken, hierbei bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 0.05$ ).

In nur einem Fall fanden sich hellrote Leichenflecken (Fall 15, 72h-Messung) ohne Linksverschiebung des Spektrums. Jeweils bei einem Fall trat eine rötliche Färbung der Leichenflecke nach 48 Stunden und bei einem nach 72 Stunden, eine spektrophotometrische Kältereoxygenierung jedoch erst nach 72 Stunden auf. Bei Leichen mit makroskopisch fehlender Reoxygenierung blieb in nahezu allen Fällen (Ausnahme: Fall 021, s.u.) eine Linksverschiebung aus. Das Messverfahren wies also eine gute Spezifität auf, wohingegen die Sensitivität deutlich schwächer ausfiel. Es stellt sich die Frage, warum ein großer Teil, nämlich 16 (47,1%) der makroskopischen rötlichen Veränderungen spektrophotometrisch nicht reproduzierbar waren. Hier kann die Annahme getroffen werden, dass eine sichtbare Linksverschiebung erst ab

Erreichen eines bestimmten Gehaltes an HbO<sub>2</sub> in den Leichenflecken auftritt, wohingegen eine makroskopische Farbänderung bereits bei geringerem Gehalt erkennbar ist. Wo hier genau der Cut-Off-Wert liegt, ist mit dieser Methode so nicht ermittelbar. Bohnert et al., welche sich bereits ausgiebig mit der Kältereoxygenierung beschäftigten, nannten in ihrer Studie einen Wert von etwa 25% HbO<sub>2</sub>, ab dem spektrophotometrisch eine Veränderung der Morphologie der Spektren ausgemacht werden konnte. Dieser Wert wurde in der genannten Studie etwa 20-40 Stunden nach Beginn der Kühlung erreicht (Bohnert et al. 2008). Möglicherweise war der Zeitraum der Kühlung in dieser Studie daher nicht lang genug.

Eine Ausnahme bildet Fall 021, hier fand sich bereits nach 24 Stunden post mortem eine Linksverschiebung, obwohl die Leiche noch bei Raumtemperatur gelagert wurde. Es fanden sich hier blau-livide Leichenflecken. Die Linksverschiebung bestand auch weiterhin bei der 48h-Messung, zu diesem Zeitpunkt waren die Leichenflecken in eine rötlich-livide Farbe übergegangen. Bei der Verstorbenen handelte es sich um eine 73 Jahre alt gewordene Frau, welche an akutem Nierenversagen mit Lungenödem und Urämie gestorben war. Der BMI lag bei 27,5 kg/m<sup>2</sup>, also im Mittelfeld. Die Kühlung war planmäßig nach 36 Stunden erfolgt, die Hauttemperatur wurde nach 24 Stunden noch mit 25°C und nach 48 Stunden mit 12°C gemessen. Es fanden sich relativ ausgeprägte Livores. Letztendlich lässt sich nicht sagen, weshalb in diesem Fall die spektrophotometrische Linksverschiebung zeitlich vor der makroskopischen Farbveränderung aufgetreten ist.

#### *Kohlenmonoxid-Messreihe*

Die zweite Messreihe umfasste sieben Verstorbene mit im Labor nachgewiesener Kohlenmonoxidvergiftung. Hierbei lagen durchweg hohe Carboxyhämoglobinwerte von über 60% vor, sodass bei allen Leichen die Intoxikation als todesursächlich angesehen werden kann. Bei fünf der sieben Verstorbenen fanden sich in der Auffindesituation Hinweise auf einen Suizid mit Holzkohlegrill. Bei zweien konnten dem Leichenbericht keine Hinweise auf die Auffindesituation entnommen werden. Von den sieben Verstorbenen waren sechs männlich, sodass das männliche Geschlecht in dieser Messreihe überrepräsentiert ist. Das Durchschnittsalter (Median) lag hier bei 57 Jahren und damit unter dem Durchschnittsalter der Verstorbenen in Hämoglobinmessreihe.

Die Kombination aus Derivativspektroskopie und Reflexionsspektroskopie war hierbei auch in diesem Feld neu. Bereits Mitte der Achtziger Jahre erfolgten Versuche zur COHb-Bestimmung mit Derivativspektroskopie, allerdings an Blutproben und unter Laborbedingungen. So untersuchten Fukui et al. mithilfe von Derivativspektroskopie die 1. bis 4. Ableitung von Absorptionsspektren von Blutproben und verglichen die Ergebnisse mit der herkömmlichen spektrophotometrischen Methode und Gaschromatographie. Hierbei handelte es sich um künstlich hergestellte Verdünnungsreihen aus heparinisierendem Vollblut mit definiertem COHb-Gehalt. Es ergab sich, dass die Derivativspektroskopie-Methode präzisere Ergebnisse liefert als die etablierten Methoden, da unerwünschte Störeffekte zum Beispiel durch Trübung herausgefiltert werden konnten (Fukui et al. 1984).

In der vorliegenden Studie wurden die im Herzblut unter Laborbedingungen spektrophotometrisch gemessenen COHb-Werte mit den jeweiligen Peakdifferenzen  $\Delta A$  der zugehörigen Spektren verglichen. Hier zeigte sich nach Auflegen einer Trendlinie, dass  $\Delta A$  tendenziell mit Zunahme der gemessenen Werte ansteigt. Der Korrelationskoeffizient zeigte eine positive, allerdings nicht signifikante Korrelation. Hier wäre zur weiteren Überprüfung eine Messreihe mit deutlich größerer Fallzahl vonnöten.

Fall CO-002, bei dem sich ein Anfangsverdacht einer Kohlenmonoxidvergiftung nicht bestätigte, wurde separat betrachtet. Hierbei zeigte das aufgenommene Spektrum trotz hellroter Livores weder mit dem Referenzspektrum von Carboxyhämoglobin noch mit dem von oxygeniertem Hämoglobin Ähnlichkeit. Die toxikologische Analyse auf verschiedene Noxen war nicht zielführend, sodass bezüglich Fall CO-002 letztendlich keine verwertbare Aussage getroffen werden konnte.

Beim direkten Vergleich der Spektren bei Kältereoxygenierung und schwerer Kohlenmonoxidintoxikation zeigte sich, dass diese sich morphologisch anhand der Lokalisationen der Peaks und Dips signifikant voneinander unterscheiden, und somit eine Unterscheidung mithilfe des Geräts möglich ist.

Hierbei gilt, dass durch die abweichende Morphologie der Spektren und die Lokalisation der Extrema auch vor Ermittlung der Blutwerte eine visuelle Unterscheidung zwischen Kohlenmonoxidvergiftung und keiner Vergiftung mithilfe des Spektrometers möglich ist. Laut Madea kommt es erst ab einem COHb-Gehalt von

etwa 30% zur typischen hellroten Färbung der Leichenflecken, wohingegen Werte von unter 20%, welche im Normalfall keine tödlichen Folgen haben, zu keiner Farbänderung der Livores führen (Madea 2015). Fraglich bleibt hierbei, ob geringere als die in dieser Studie gemessenen CO-Hb-Konzentrationen ebenso zuverlässig durch das Gerät detektiert werden, oder ob solche Konzentrationen, welche z.B. bei Mischintoxikationen bereits tödliche Auswirkungen haben können (Vevelstad und Morild 2009), vom Gerät ebenfalls identifiziert werden können. Ein Cut-Off-Wert konnte hierbei aufgrund der kleinen Stichprobenzahl und der durchweg sehr hohen Konzentrationen bei todesursächlicher Intoxikation nicht festgelegt werden.

Bohnert et al. fanden im Jahre 1999 zunächst heraus, dass mithilfe von reflexionsspektrophotometrischen Messungen eine sichere Differenzierung erst ab einem COHb-Blutwert von 52% möglich war. Weiterhin wurde in dieser Arbeit konstatiert, dass Reflexionsspektren des COHb in Leichenflecken und Absorptionsspektren des im Labor gemessenen Blutwertes von COHb nicht exakt ineinander konvertiert werden können, da zu viele individuelle, nicht messbare Einflussfaktoren vorliegen (z.B. Farbe, Dicke, Struktur der Haut), wohingegen im Labor standardisierte Bedingungen vorherrschen (Bohnert et al. 1999). Unter Hinzunahme eines mathematischen Hautmodells auf Basis von Monte-Carlo-Simulationen (Wang et al. 1995, Walther 2004) konnten die Ergebnisse der Messungen in einer weiteren Studie deutlich verbessert und auch deutlich niedrigere Kohlenmonoxidwerte anhand von Leichenflecken nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die Messergebnisse größere Abweichungen vom tatsächlichen Blutgehalt, je geringer der Gehalt an COHb war (Bohnert et al. 2005).

Wie schon erwähnt, kommt es bei Kohlenmonoxidbelastung der Umgebungsluft zum Durchtritt von CO durch die Haut in die Livores, hierbei spielt die Expositionsdauer und der Gehalt an CO in der Atemluft eine Rolle (Sully et al. 2018). Da der exakte Todeszeitpunkt der Verstorbenen in dieser Messreihe nicht bekannt war, muss davon ausgegangen werden, dass die Leichen unterschiedlich lange am Sterbeort gelegen und einer erhöhten Kohlenmonoxidbelastung ausgesetzt gewesen waren. Eine exakte quantitative Bestimmung des COHb-Gehaltes im Blut ist mit dieser Methode schwierig zu realisieren, da der Gehalt im zentralen Leichenblut in der Regel nicht genau dem der Leichenflecken entspricht. Die erhobenen Ergebnisse lassen jedoch die Annahme zu, dass ein erhöhter Wert im zentralen Blut zu Spektren mit größerer Intensität führt,

sodass ein Gerät mit einer Art Ampelsystem im Sinne einer qualitativen Analyse in der Zukunft denkbar wäre. Dies deckt sich mit den o.g. Ergebnissen von Bohnert et al.

### **5.3 Limitationen**

Insgesamt wurden Messungen bei 48 Verstorbenen durchgeführt, wovon vier Fälle aufgrund verschiedener Aspekte von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Somit ergeben sich 44 valide Fälle, 37 für die Hb-Derivat-Messreihe und sieben für die COHb-Messreihe. Eine größere Fallzahl war aufgrund der strengen Einschlusskriterien schwierig zu realisieren. Einige Körper wurden trotz Erfüllen der Kriterien direkt nach Eintreffen im Institut für Rechtsmedizin in die Kühlung überführt und kamen daher für die vorliegende Studie nicht mehr infrage. Von den Verstorbenen, welche in die Studie einbezogen worden waren, wurde ein Teil bereits vor Ende der Messreihe obduziert oder vom Bestatter abgeholt und stand somit für die späteren Messzeitpunkte nicht mehr zur Verfügung. Da zum einen nur wenige Verstorbene ein postmortales Intervall von unter 11,5 Stunden aufwiesen und zum anderen einige Körper bereits vor Ablauf der 72 Stunden abgeholt wurden, waren bei den Messungen die sehr frühen beziehungsweise sehr späten Zeitpunkte unterrepräsentiert. Über ein Drittel der Toten war an Kreislauferkrankungen verstorben, über die Vormedikation war nichts bekannt. Da in der Klinik ein Großteil der Patienten mit Herzerkrankungen Thrombozytenaggregationshemmer oder Antikoagulantien einnehmen (z.B. bei KHK, VHF, pAVK etc.), kann ein Einfluss auf die Messergebnisse hier nicht ausgeschlossen werden.

Zur Betrachtung des Reoxygenierungseffekts, sowie um einer frühzeitigen Fäulnis vorzubeugen, wurden die Verstorbenen nach 36 Stunden in eine kältere Umgebung überführt. Diese Veränderung entspricht nicht den „realen“ Bedingungen von aufgefundenen Toten außerhalb des rechtsmedizinischen Instituts. In der Auswertung zur Entwicklung der Hämoglobinderivate wurden daher nur die Werte innerhalb der ersten 24 Stunden nach Eintreffen des Todes berücksichtigt. Da im klinischen Alltag viele Leichen erst später als 24 Stunden post mortem aufgefunden werden, können die vorliegenden Ergebnisse auf diese Fälle nicht angewendet werden. Die Bewertung der Farbe der Leichenflecken erfolgte wie im klinischen Alltag mit dem bloßen Auge durch den Untersucher, weswegen hier Subjektivität die Bewertung beeinflusst haben kann.

Bezüglich der Kohlenmonoxidmessreihe stellte ebenfalls die kleine Stichprobenmenge die größte Limitation dar. Nur bei einem Teil der insgesamt aufgefundenen Leichen im Messzeitraum wurde von Anfang an der Verdacht auf eine Kohlenmonoxidintoxikation geäußert (z.B. aufgrund der Auffindsituation bei Suizid mit Holzkohlegrill). Bei einigen Verstorbenen konnte erst nach Obduktion und Laboranalyse ein erhöhter Kohlenmonoxidgehalt im Blut nachgewiesen werden, was die Verstorbenen für die Studie ausschloss, und weshalb nur eine verhältnismäßig geringe Fallzahl in die Studie einging. Ebenfalls kritisch zu betrachten ist der Umstand, dass alle Verstorbenen dieser Messreihe bereits unterschiedlich lange postmortale Intervalle aufwiesen, welche nicht einwandfrei bestimmt werden konnten, da der genaue Todeszeitpunkt nicht bekannt war.

Wie schon in vorangegangenen Studien, in welchen reflexionsspektroskopische Messungen an menschlicher Haut durchgeführt wurden (Bohnert et al. 2005, Schulz 2009, Hughes und Langlois 2010, Garcia-Urbe et al. 2011, Watchman et al. 2011), war auch in dieser Studie von einer großen Zahl von interindividuell unterschiedlichen Einflussfaktoren wie BMI, Hautkolorit, Körpertemperatur, Körperbehaarung, Wassereinlagerungen, Lagerungsbedingungen vor Beginn der Messungen usw. auszugehen. Eine weitergehende Analyse diesbezüglich erfolgte aufgrund der relativ kleinen Fallzahl nicht, da hierbei keine validen Rückschlüsse zu erwarten gewesen wären.

Es fiel auf, dass die Messwerte für Intensitäten und Prozentwerte der Hb-Derivate zum Ende vermehrt streuten und zunehmend unplausible Werte ergaben. Dies könnte zum Beispiel mit einem Nachlassen der LED-Leistung mit der Zeit zusammenhängen, wobei die zugehörigen Spektren unverändert vielversprechend aussahen. Dieser Umstand erfordert weitergehende Fehleranalysen.

## **5.4 Ausblick**

Bereits mehrere Autoren untersuchten verschiedene Methoden zur Todeszeitbestimmung anhand von Leichenflecken. Hierbei lagen verschiedene interindividuelle Einflussfaktoren (Hautfarbe, BMI, Alter, Vorerkrankungen,

Todesursache) und Umweltfaktoren (Temperatur, Feuchtigkeit, Liegedauer etc.) vor, welche bisher einer allgemein anwendbaren Methode im Wege standen. Zudem stellt die Haut an sich als optisch trübes Medium ein Problem bei spektrophotometrischen in-vivo-Messungen dar (Walther 2004). Trotz Normierungsmessungen in leichenfleckfreien Hautarealen und Verwendung von Derivativspektroskopie ließen sich keine zuverlässigen Aussagen über Konzentrationsbestimmungen von Hämoglobinderivaten machen. Beim Monte-Carlo-basierten Hautmodell handelt es sich um ein mathematisches Modell zur Berechnung von Photonenwegen in trüben, mehrschichtigen Medien (Wang et al. 1995). Mithilfe der Anwendung dieses Modells ließen sich durch Bohnert et al. deutlich akkuratere Messergebnisse erzielen (Bohnert et al. 2005). Die Anwendung eines Hautmodells wird daher zukünftig wahrscheinlich nicht zu umgehen sein.

Bezüglich der anderen genannten Einflussfaktoren wurde bereits mehrfach versucht, eine allgemeingültige Formel zu entwickeln, welche die Unterschiede berücksichtigt und eine Todeszeiteinschätzung ermöglicht; bisher konnten jedoch noch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, welche eine große Zahl an möglichen Einflussfaktoren berücksichtigen (Kaatsch et al. 1993, Usumoto et al. 2010). Hier sind Messreihen mit deutlich größeren Fallzahlen vonnöten, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können, was durch manuelle Messungen so nicht zu realisieren ist. Wülker et al. entwickelten ein robotergestütztes Messsystem zur spektroskopischen Vermessung von Leichenflecken, welches engmaschige Messungen über einen langen Zeitraum an einer großen Anzahl Verstorbener ermöglicht (Wülker et al. 2012). Eine Konsequenz aus der Erhebung vieler Messungen ist das Vorliegen immenser Datenmengen, was ein Problem bei der Speicherung und Auswertung darstellt.

Einen bereits viel genutzten Ansatz stellt die Möglichkeit der computergestützten Auswertung umfassender spektroskopischer Datensätze dar (Goodarzi und dos Santos Coelho 2014, Li et al. 2014, Hu et al. 2017, Weng et al. 2018, Fabelo et al. 2018). Ende 2018 wurde ein Cochrane Review zu *computer assisted diagnosis* (CAD, unter anderem mithilfe Neuronaler Netzwerke, decision trees und support vector machines/SMVs) maligner Hautläsionen veröffentlicht (Di Ferrante Ruffano et al. 2018).

Die Anwendung von spektroskopischer und spektrophotometrischer Messmethoden und Auswertung mithilfe künstlicher Intelligenz ist in Bereichen wie beispielsweise der Agrarindustrie (Landeta-Escamilla et al. 2019), Umweltforschung (Fawzy et al. 2018) oder Lebensmittelindustrie (Torrecilla et al. 2015) vielversprechender Gegenstand aktueller Forschung. Eine Anwendbarkeit zur Verarbeitung großer Datensätze mit Bestimmung der postmortalen Zeit unter Einbeziehung vieler möglicher Einflussfaktoren ist denkbar.

Bezüglich der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass ein Einsatz des Spektrometers der Firma DERMALOG zur schnellen Detektion von todesursächlicher Kohlenmonoxidintoxikation bei aufgefundenen Verstorbenen denkbar ist. Hierzu müssten jedoch weitere Studien mit deutlich größerer Fallzahl erfolgen. Zudem wäre eine Weiterentwicklung des Geräts in Betracht zu ziehen, sodass es unterwegs kabellos mit Akku und ohne Laptop genutzt werden könnte, zum Beispiel im Sinne eines Ampelsystems zur schnellen Risikobewertung und der Möglichkeit späterer Auslesung der Daten per Computersoftware.

## **6 Zusammenfassung**

### **6.1 Deutsch**

Aktuell ist es noch nicht möglich, in der Rechtsmedizin den Todeszeitpunkt eines aufgefundenen Verstorbenen zuverlässig und genau zu bestimmen. Ein weiteres Problem stellen hellrote Leichenflecken dar, welche zum einen durch Kälteexposition, zum anderen jedoch auch durch Vergiftungen, insbesondere Kohlenmonoxid (CO), hervorgerufen werden können. Bisher gibt es keine Möglichkeit einer nicht-invasiven Schnelldiagnostik bei aufgefundenen Leichnamen mit hellroten Livores.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von spektrophotometrischen Messungen im VIS und NIR-Bereich an insgesamt 44 Verstorbenen die Hämoglobinderivate in Leichenflecken untersucht. Die Messungen erfolgten in Reflexion, die Auswertung mithilfe von Derivativspektroskopie anhand der zweiten Ableitung der Extinktion. Es wurden in der ersten Messreihe (37 Fälle) die vier Hämoglobinderivate reduziertes Hämoglobin (RHb), oxygeniertes Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>), Carboxyhämoglobin (COHb) und Methämoglobin (MetHb), im zeitlichen Verlauf untersucht, um die Zusammensetzung und das Verhalten zu prüfen, und ob diese zur Eingrenzung des



Todeszeitpunkts beitragen können. In einer zweiten Messreihe erfolgten einmalig spektrophotometrische Messungen innerhalb von hellroten Livores bei sieben Verstorbenen mit Kohlenmonoxidintoxikation, um herauszuarbeiten, ob mithilfe des Geräts eine Unterscheidung zwischen Kälteexposition und Kohlenmonoxidvergiftung möglich ist.

Bezüglich der Hämoglobinderivate ließen sich keine Rückschlüsse über den Todeszeitpunkt ziehen, was auch auf viele interindividuelle Unterschiede der Körper (BMI, Vorerkrankungen, Alter) und verschiedene Lagerungsbedingungen (Liegezeit und -ort, Umgebungstemperatur etc.) zurückzuführen ist. In der zweiten Gruppe konnte hingegen bei durchweg hohen Kohlenmonoxidwerten im Blut eine Unterscheidung zwischen (tödlicher) CO-Vergiftung und Kälteexposition erfolgen, was die Entwicklung eines mobilen Geräts zur nicht-invasiven Detektion einer Kohlenmonoxidvergiftung bei Verstorbenen in naher Zukunft denkbar macht.

Die größte Limitation stellte aufgrund der strengen Einschlusskriterien die kleine Fallzahl dar. Um Ergebnisse zu erzielen, welche alle möglichen individuellen Einflussfaktoren mit einzubeziehen vermögen, sind weitere Studien mit einer deutlich größeren Fallzahl erforderlich.

## **6.2 English**

Currently it is not possible to determinate the time of death of a deceased person accurately. The presence of bright red livores represents another problem in the field of legal medicine, for it can be caused either by postmortal cold exposition or by intoxications, especially with carbon monoxide. There is no tool for non-invasive and fast diagnostic of found bodies with bright red livores.

In the present dissertation spectrophotometric measurements in the VIS and NIR range were performed on 44 bodies in order to examine the development of the colour and the composition of lividity during the post mortem interval. The measurements were executed in reflexion and the analysis was performed through derivative spectroscopy using the second derivation of the extinction.

In the first series of measurements (37 cases) the focus was set on four different hemoglobin-derivatives within the livores, namely reduced hemoglobin (RHb), oxygenated hemoglobin (HbO<sub>2</sub>), carboxyhemoglobin (COHb) and methemoglobin (MetHb). These derivatives were examined at different points of time during the post

mortem interval to investigate the composition and the development and if these can contribute to the determination of the time of death. In a second series single measurements within bright red livores of seven victims of carbon monoxide intoxication were performed to find out if it is possible to distinguish between an exposition to a cold environment and carbon monoxide intoxication using the spectrometer.

Concerning the hemoglobin derivatives it was not possible to draw conclusions to the time of death, which was due to many interindividual differences of the bodies (BMI, medical history, age) and conditions of storage of the corpses (post mortem time and place of the finding, ambient temperature etc.). In the second group, which included bodies with presence of high carbon monoxide blood levels, a distinction between carbon monoxide intoxication and postmortal exposition to cold could indeed be effectuated. Thus it appears that the device can be effectively used for non-invasive determination of carbon monoxide intoxication in corpses in the near future.

The most significant limitation of this study is presented by the small number of cases. To achieve reliable results, which include many possible influencing factors, more studies with a higher number of cases are required.

## VI      **Anhang**

### **VI.I**    Tabellen

**Tabelle 5: Fälle der Hämoglobinderivat-Messreihe**

Fall-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [m=männl; w=weibl]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
003	71	m	15,9
004	69	m	22,6
005	79	m	17,5
006	76	m	28,9
007	82	w	25,1
008	78	w	19,7
009	69	m	21,6
010	81	m	22,9
011	87	w	35,3
012	69	m	28,6
013	48	m	29,4
014	57	m	27,6
015	23	w	37,1
016	89	w	20,6
017	53	w	31,6
018	46	m	34,2
019	77	m	30,8
020	86	w	20,8
021	73	w	27,5
022	56	m	27,9
023	78	w	34,1
025	46	m	25,6
026	85	m	28,7
027	88	m	29,6
028	82	m	31,2
029	45	m	32,0
030	68	w	25,8
031	60	m	31,6

032	70	m	20,6
033	73	m	32,4
034	82	m	22,1
035	69	m	37,3
036	79	m	27,4
037	69	w	22,6
038	94	m	21,9
039	70	m	20,5
040	61	w	38,6

**Tabelle 6: Fälle der Kohlenmonoxid-Messreihe, ausgeschlossener Fall grau unterlegt**

CO-Fall-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [m=männlich; w=weiblich]	CO-Gehalt im Blut [%]
CO-001	46	m	75,8
CO-002	67	w	<5
CO-003	57	m	73
CO-004	83	w	81
CO-005	62	m	80
CO-006	73	m	62
CO-007	45	m	70
CO-008	30	m	70

**Tabelle 7: Anteile der einzelnen Hämoglobinderivate pro Fall und post mortalem Zeitpunkt [%]**

Fall	pm-Zeit[h]	COHb[%]	HbO2 [%]	MetHb[%]	RHb[%]	
	3	11,5	1,55E-07	1,55E-07	1,4033	98,5967
	3	17,5	1,11E-07	1,11E-07	17,8644	82,1356
	3	24	1,589	0,6355	15,0303	82,7452
	3	48	1,6818	40,4145	21,5192	36,3845
	4	5,5	2,62E-07	2,62E-07	2,62E-07	100
	4	11,5	2,83E-07	2,83E-07	5,51E-07	100
	4	17,5	6,33E-07	6,33E-07	6,33E-07	100
	4	24	9,62E-08	9,62E-08	10,8578	89,1422
	4	48	1,18E-07	1,18E-07	6,4652	93,5348
	4	72	1,49E-07	5,5284	16,0016	78,47
	5	11,5	6,40E-07	0,4735	17,7702	81,7563
	5	17,5	0,2565	6,71E-08	23,6719	76,0716
	5	24	9,40E-08	9,40E-08	14,5691	85,4309

5	48	1,20E-07	10,232	15,5231	74,2449
6	5,5	1,29E-07	1,29E-07	1,29E-07	100
6	11,5	3,29E-07	3,29E-07	3,29E-07	100
6	17,5	2,01E-07	2,01E-07	0,822	99,178
6	24	1,78E-07	1,78E-07	1,7394	98,2606
6	48	0,5694	0,8806	41,3589	57,1911
6	72	1,6229	6,8136	54,4142	37,1493
7	11,5	9,72E-08	9,80E-08	16,0684	83,9316
7	17,5	7,22E-08	7,22E-08	7,9515	92,0485
7	24	8,49E-08	8,49E-08	8,7604	91,2396
7	48	1,21E-07	2,7866	16,7595	80,4539
8	5,5	1,43E-07	1,43E-07	1,43E-07	100
8	11,5	2,02E-07	2,02E-07	3,9772	96,0228
8	17,5	2,12E-07	2,12E-07	8,5117	91,4883
8	24	6,42E-08	6,42E-08	20,2228	79,7772
8	48	0,0207	1,11E-07	1,20E-07	99,9793
9	5,5	2,68E-07	2,68E-07	4,13E-07	100
9	11,5	1,72E-05	19,3851	10,5784	70,0365
9	17,5	1,99E-07	1,99E-07	1,99E-07	100
9	24	1,80E-07	1,80E-07	1,80E-07	100
9	48	32,0165	67,9835	1,51E-07	1,51E-07
9	72	1,4478	36,5991	16,8654	45,0877
10	11,5	3,75E-07	3,75E-07	6,6464	93,3536
10	17,5	0,4869	35,042	8,21E-01	64,471
10	24	4,49E-07	4,49E-07	4,66E-07	100
10	48	1,63E-06	1,2259	16,3184	82,4556
10	72	1,55E-05	29,2475	20,2198	50,5327
11	5,5	4,63E-07	4,63E-07	6,86E-07	100
11	11,5	1,80E-07	1,80E-07	5,9938	94,0062
11	17,5	2,47E-07	2,47E-07	11,1583	88,8417
11	24	2,64E-07	2,64E-07	2,64E-07	100
12	5,5	1,77E-07	1,77E-07	9,8991	90,1009
12	11,5	2,19E-07	2,19E-07	2,19E-07	100
12	17,5	1,25E-07	1,25E-07	6,1811	93,8189
12	24	1,03E-07	1,03E-07	7,309	92,691
12	48	8,95E-08	8,95E-08	2,1409	97,8591
12	72	8,55E-08	1,3093	14,2359	84,4548
13	11,5	1,52E-07	1,52E-07	4,8617	95,1383
13	17,5	1,66E-07	1,66E-07	6,2237	93,7763
13	24	1,33E-07	1,33E-07	6,1857	93,8143
13	48	1,08E-07	1,08E-07	13,3825	86,6175
13	72	4,9025	38,8045	18,6873	37,6057
14	5,5	1,65E-07	1,65E-07	1,65E-07	100

14	11,5	1,71E-07	1,71E-07	2,46E-07	100
14	17,5	1,22E-07	1,22E-07	21,8894	78,1106
14	24	1,9798	1,62E-07	14,708	83,3123
14	48	3,54E-03	13,6767	33,3927	52,9306
14	72	1,45E-04	25,8054	23,3476	35,8564
15	11,5	1,03E-07	1,03E-07	10,7919	89,2081
15	17,5	1,16E-07	1,16E-07	14,7897	85,2103
15	24	1,03E-07	5,68E-02	13,0367	86,9633
15	48	7,97E-04	0,5105	16,4575	83,032
15	72	1,48E-07	1,48E-07	0,8201	99,1799
16	5,5	8,03E-08	8,03E-08	13,7557	86,2443
16	11,5	9,53E-08	9,53E-08	7,5816	92,4184
16	17,5	7,60E-08	7,60E-08	10,7332	89,2668
16	24	0,0928	2,78E-05	8,3378	91,5694
16	48	3,30E-03	49,7825	16,1323	34,0852
17	5,5	1,27E-07	1,27E-07	1,27E-07	100
17	11,5	7,87E-08	7,87E-08	11,3088	88,6912
17	17,5	7,99E-08	7,99E-08	16,6349	83,3651
18	11,5	1,21E-07	1,21E-07	1,21E-07	100
18	17,5	1,23E-07	1,23E-07	1,43E-07	100
19	5,5	0,5786	1,4238	0,2088	97,7887
19	11,5	1,8923	1,40E-07	1,40E-07	98,1077
19	17,5	1,6843	1,0406	3,62E-05	97,2751
19	24	2,801	0,2009	1,68E-07	96,9981
19	48	1,9573	1,2398	5,63E-05	96,803
19	72	2,6411	5,1072	2,57E-07	92,2516
20	11,5	0,6367	2,4121	1,58E-04	96,9512
20	17,5	0,737	1,8555	2,19E-07	97,4075
20	24	0,7939	3,2808	3,22E-07	95,9253
21	11,5	0,7616	0,7834	6,4984	91,9567
21	17,5	1,4209	0,4424	3,4372	94,6995
21	24	5,5949	48,3907	4,3507	41,6637
21	48	8,7489	48,356	8,0004	34,8946
22	11,5	0,0014	1,26E-07	1,26E-07	99,9986
22	17,5	0,8569	0,2824	0,0115	98,8491
22	24	1,1744	0,114	4,314	94,3976
22	48	10,0694	18,943	18,0786	52,909
22	72	14,8607	46,7739	15,6928	22,6726
23	11,5	1,3546	2,08E-07	1,8649	96,7805
23	17,5	1,1171	0,4331	6,355	92,0948
26	5,5	6,16E-04	0,6942	15,7457	83,5602
26	11,5	1,15E+00	0,3047	13,7954	85,8998
26	17,5	0,6949	0,6878	22,6242	75,9931

26	24	0,5473	0,61	21,339	77,5038
26	48	1,045	0,7112	21,6949	76,5489
27	5,5	1,01E-07	1,01E-07	12,9181	87,0819
27	11,5	7,78E-08	7,78E-08	14,0043	85,9957
27	17,5	8,41E-08	8,41E-08	18,1084	81,8916
27	24	6,76E-08	6,76E-08	14,0946	85,9054
27	48	14,3291	58,8596	1,15E-07	26,8113
27	72	20,7619	58,4154	1,37E-04	20,8226
28	5,5	1,43E-07	1,43E-07	21,1687	78,8313
28	11,5	1,47E-07	0,262	16,4562	83,2818
28	17,5	0,4413	0,4323	23,0556	76,0707
28	24	0,252	0,5408	22,8155	76,3917
28	48	0,1075	0,1525	19,428	80,312
29	5,5	1,43E-07	1,43E-07	21,1687	78,8313
29	11,5	1,47E-07	0,262	16,4562	83,2818
29	17,5	0,4413	0,4323	23,0556	76,0707
29	24	0,252	0,5408	22,8155	76,3917
29	48	0,1075	0,1525	19,428	80,312
30	11,5	1,73E-07	1,74E-07	12,7549	87,2451
30	17,5	1,13E-04	0,6662	23,5842	75,7496
30	24	0,3185	0,7794	25,0194	73,8827
30	48	0,0044	6,83E-05	18,901	81,0946

## VI.II Dokumentationsbogen

Dokumentationsbogen Nr. \_\_\_

L-Nummer: \_\_\_\_\_

S-Nummer: \_\_\_\_\_

Unterlagen: \_\_\_\_\_

Geschlecht: männlich \_\_\_ weiblich \_\_\_

vorhanden beigefügt

Alter: \_\_\_\_\_ Gewicht | \_\_\_\_\_ Größe: \_\_\_\_\_

BMI: \_\_\_\_\_

Todesursache: \_\_\_\_\_

Todeszeitpunkt (+/- 0,5h): \_\_\_\_\_

Sektionsantrag  
(vorl.) Todesbescheinigung  
Obduktionsbogen  
Notarzt-/~~Rettungsdienstbesch.~~  
(Arztbrief)  
Leichenbericht

Zeit p.m.	Uhrzeit/Datum	Umgebungs-temp.	Haut-temp.	Temp. rektal	Livores: Ausprägung	Livores: Farbe	Livores: Wegdrückbarkeit	Livores: Konfluiert
5,5h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein
11,5h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein
17,5h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein
24h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein
48h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein
72h					<input type="checkbox"/> spärlich <input type="checkbox"/> mittelkräftig <input type="checkbox"/> kräftig	<input type="checkbox"/> blau-livide <input type="checkbox"/> rötlich-livide <input type="checkbox"/> hellrot <input checked="" type="checkbox"/> braunrot	<input type="checkbox"/> vollständig <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nicht	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> nein

Anmerkungen: \_\_\_\_\_



## **VII            Literaturverzeichnis**

- [1] Anderson, R; Parrish, JA (1981): The optics of human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 77 (1), 13-19.
- [2] Arndt, T; Gressner, AM (2013): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2nd Ed. Berlin [u.a.]: Springer, 420.
- [3] Belenki, L; Sterzik, V; Schulz, K; Bohnert, M (2013): Analyzing reflectance spectra of human skin in legal medicine. *Journal of Biomedical Optics* 18 (1), 17004.
- [4] Berg, JM; Tymoczko, JL; Gatto, GJ; Stryer, L (2018): *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 230-232.
- [5] Bergmann, L; Schaefer, C (2004): *Lehrbuch der Experimentalphysik. Optik Wellen- und Teilchenoptik*. 10th ed. Berlin- New York: Walter de Gruyter. 203-206, 284.
- [6] Bohnert, M; Schulz, K; Belenkaia, L; Liehr, AW (2008): Re-oxygenation of haemoglobin in livores after post-mortem exposure to a cold environment. *Int J Legal Med* 122 (2), 91-96.
- [7] Bohnert, M; Walther, R; Roths, T.; Honerkamp, J (2005): A Monte Carlo-based model for steady-state diffuse reflectance spectrometry in human skin: estimation of carbon monoxide concentration in livor mortis. *Int J Legal Med* 119 (6), 355-362.
- [8] Bohnert, M; Weinmann, W; Pollak, S (1999): Spectrophotometric evaluation of postmortem lividity. *Forensic Science International* 99 (2), 149-158.
- [9] Boron, WF; Boulpaep, EL (2005): *Medical physiology. A cellular and molecular approach*. Updated ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders, 425.

- [10] Bremmer, RH; Nadort, A; van Leeuwen, TG; van Gemert, MJC; Aalders, MCG (2011): Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic Science International* 206 (1-3), 166-171.
- [11] Buddecke, E; Fischer, M (1992): *Pathophysiologie, Pathobiochemie, klinische Chemie. Für Studierende der Medizin und Ärzte.* Berlin, New York: Walter de Gruyter, 219.
- [12] Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (2013): *Katastrophenmedizin. Leitfaden für die ärztliche Versorgung im Katastrophenfall.* 6. Aufl., unveränd. Nachdruck. Bonn, 239.
- [13] Chakravarti, S, Srivastava, S, Mitnacht, AJC (2008). Near infrared spectroscopy (NIRS) in children. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 12(1), 70-79.
- [14] Cortis, J; Bender, K; Rothschild, MA; Kamphausen, T (2015): Tödliche Holzpellets. *Rechtsmedizin* 25 (2), 101-106.
- [15] Deniz, T; Kandis, H; Eroglu, O; Gunes, H; Saygun, M; Kara, IH (2017): Carbon monoxide poisoning cases presenting with non-specific symptoms. *Toxicology and industrial health* 33 (1), 53-60.
- [16] Di Ferrante Ruffano, L; Takwoingi, Y; Dinnes, J; Chuchu, N; Bayliss, SE.; Davenport, C et al. (2018): Computer-assisted diagnosis techniques (dermoscopy and spectroscopy-based) for diagnosing skin cancer in adults. *The Cochrane database of systematic reviews* 12, CD013186.
- [17] DIMDI (2018): *Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision German Modification Version 2019.* Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. [online im Internet] URL: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2019/> [abgerufen am 01.03.2019].

- [18] Evenson, MA (1999): Spectrophometric techniques. In: Tietz, NW; Burtis, CA; Ashwood, ER (Eds.): Tietz textbook of Clinical chemistry. 5th ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders, 57-73.
- [19] Fabelo, H; Ortega, S; Casselden, E; Loh, J; Bulstrode, H; Zolnourian, A et al. (2018): SVM Optimization for Brain Tumor Identification Using Infrared Spectroscopic Samples. *Sensors (Basel, Switzerland)* 18 (12).
- [20] Fawzy, M; Nasr, M; Nagy, H; Helmi, S (2018): Artificial intelligence and regression analysis for Cd(II)ion biosorption from aqueous solution by *Gossypium barbadense* waste. *Environmental science and pollution research international* 25 (6), 5875-5888.
- [21] Fujihara, J; Kinoshita, H; Tanaka, N; Yasuda, T; Takeshita, H (2013): Accuracy and usefulness of the AVOXimeter 4000 as routine analysis of carboxyhemoglobin. *Journal of forensic sciences* 58 (4), 1047-1049.
- [22] Fukui, Y; Matsubara, M; Takahashi, S; Matsubara, K (1984): A study of derivative spectrophotometry for the determination of carboxyhemoglobin in blood. *Journal of Analytical Toxicology* 8 (6), 277-281.
- [23] Fullerton, A; Fischer, T; Lahti, A; Wilhelm, KP; Takiwaki, H; Serup, J (1996): Guidelines for measurement skin colour and erythema. A report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 35 (1), 1-10.
- [24] Garcia-Urbe, A; Smith, EB; Zou, J; Duvic, M; Prieto, V; Wang, LV (2011): In-vivo characterization of optical properties of pigmented skin lesions including melanoma using oblique incidence diffuse reflectance spectrometry. *Journal of Biomedical Optics* 16 (2), 020501-1.
- [25] Gauglitz, G; Moore, DS (2014): Handbook of spectroscopy, 4 Volume Set. 2., enl. ed. Weinheim: Wiley, 114-115.

- [26] Gehrcke, E (1927): Handbuch der physikalischen Optik. In zwei Bänden. Leipzig: J.A. Barth, 102.
- [27] Goodarzi, M; dos Santos Coelho, L (2014): Firefly as a novel swarm intelligence variable selection method in spectroscopy. *Analytica chimica acta* 852, 20-27.
- [28] Gressner, AM; Arndt, T (2007): *Klinische Chemie. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 1. Ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag (1), 1199.
- [29] Hapke, B (2011): Reflectance spectroscopy. In: Bruce Hapke (Ed.): *Theory of Reflectance and Emittance Spectroscopy*. Cambridge: Cambridge University Press, 369-411.
- [30] Hayes, AW (2008): *Principles and methods of toxicology*. 5th ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 1333.
- [31] Hecht HG (1976): The Interpretation of diffuse reflectance spectra. *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and chemistry*, 80A(4), 567-583.
- [32] Henssge, C; Madea, B (1988): Methoden zur Bestimmung der Todeszeit an Leichen. Lübeck: M. Schmidt-Römhild (*Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*, 18), 125.
- [33] Henssge, C; Madea, B (2003): Frühe Leichenerscheinungen. In: Brinkmann, Madea (Eds.): *Handbuch gerichtliche Medizin*, Vol. 1. 1. Ed. 2 Bände. Berlin: Springer, 79-150.
- [34] Henssge, C; Madea, B; Gallenkemper, E (1985): Todeszeitbestimmung - Integration verschiedener Teilmethoden. *Z Rechtsmed* 95 (3), 185-194.
- [35] Hesse, M; Meier, H; Zeeh, B; Bienz, S; Bigler, L; Fox, T (2016): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 9. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 29.

- [36] HmbGVBl (2000): Gesetz zur Regelung von klinischen, rechtsmedizinischen und anatomischen Sektionen (Sektionsgesetz) §7-§11. HmbGVBl, 38.
- [37] von Hofmann, E; Haberda, A (1927): Eduard R. v. Hofmanns Lehrbuch der gerichtlichen Medizin: mit gleichmäßiger Berücksichtigung der deutschen und österreichischen Gesetzgebung: Urban & Schwarzenberg, 879, 1025-1027.
- [38] Hoshi, Y (2003): Functional near-infrared optical imaging: Utility and limitations in human brain mapping. *Psychophysiology* 40 (4), 511-520.
- [39] Hu, X; Fang, G; Han, A; Fu, Y; Tong, R; Wang, S (2017): Rapid detection of six phosphodiesterase type 5 enzyme inhibitors in healthcare products using thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with BP neural network. *Journal of separation science* 40 (11), 2506-2514.
- [40] Hughes, VK; Langlois, NEI (2010): Use of reflectance spectrophotometry and colorimetry in a general linear model for the determination of the age of bruises. *Forensic Sci Med Pathol* 6 (4), 275-281.
- [41] Inoue, M; Suyama, A; Matuoka, T; Inoue, T; Okada, K; Irizawa, Y (1994): Development of an instrument to measure postmortem lividity and its preliminary application to estimate the time since death. *Forensic Science International* 65 (3), 185-193.
- [42] Jöbsis, FF (1977): Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* (198(4323)), 1264-1267.
- [43] Kaatsch, HJ; Stadler, M; Nietert, M (1993b): Photometric measurement of color changes in livor mortis as a function of pressure and time. *Int J Leg Med* 106 (2), 91-97.

- [44] Kaatsch, HJ; Schmidtke, E; Nietsch, W (1993a): Photometric measurement of pressure-induced blanching of livor mortis as an aid to estimating time of death. *Int J Leg Med* 106 (4), 209-214.
- [45] Kessler H (1951): Zur Differentialdiagnose der Einwirkung von Kälte oder Kohlenoxyd auf die Färbung der Hypostase. Dissertation, Universität Heidelberg
- [46] Kessler, W (2006): Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Ein Lehrbuch. Hoboken, NJ, Weinheim: Wiley-InterScience; Wiley-VCH, 70-75.
- [47] Kochs, E; Boemke, W; Adams, HA (2009): Anästhesiologie. 316 Tabellen. 2., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme, 407.
- [48] Kojima, T; Nishiyama, Y; Yashiki, M; Une, I (1982): Postmortem formation of carbon monoxide. *Forensic Sci Int* 19 (3), 243-248.
- [49] Kojima, T; Okamoto, I; Yashiki, M; Miyazaki, T; Chikasue, F; Degawa, K et al. (1986): Production of carbon monoxide in cadavers. *Forensic Sci Int* 32 (2), 67-77.
- [50] Kortüm, G (1969): Reflexionsspektroskopie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1-3.
- [51] Krause, D (2003): Leichenerscheinungen und Todeszeitbestimmung. In: Brinkmann B, Madea B. (Hrsg.), *Handbuch gerichtliche Medizin*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer (1), 150-169.
- [52] Kricka, P (2006): Optical Techniques. In: Burtis, CA; Ashwood, ER; Bruns, DE (Hrsg). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. St Louis: Elsevier Saunders. 6. Edition, 61-91.

- [53] Landeta-Escamilla, O; Sandoval-Gonzalez, O; Martínez-Sibaja, A; Flores-Cuautle, JJA; Posada-Gómez, R; Alvarado-Lassman, A (2019): Intelligent spectroscopy system used for physicochemical variables estimation in sugar cane soils. *Sensors* (Basel, Switzerland) 19 (2).
- [54] Laves, W (1929): Über den Einfluß von Blausäuredämpfen auf die Farbe der Totenflecke. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 13 (1), 261-269.
- [55] Li, L; Zhang, Q; Ding, Y; Jiang, H; Thiers, BH; Wang, JZ (2014): Automatic diagnosis of melanoma using machine learning methods on a spectroscopic system. *BMC medical imaging* 14, 36.
- [56] Lüllmann, H; Mohr, K; Hein, L (2006): *Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen: ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker.* 16th ed. Stuttgart: Georg Thieme, 507.
- [57] Madea, B (2003): *Praxis Rechtsmedizin. Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung; mit 172 Tabellen.* Berlin: Springer, 35-40.
- [58] Madea, B (2015): *Rechtsmedizin.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 61-62.
- [59] Mesquita, RC; Durduran, T; Yu, G; Buckley, EM; Kim, MN; Zhou, C et al. (2011): Direct measurement of tissue blood flow and metabolism with diffuse optics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 369 (1955), 4390-4406.
- [60] Mitsuta, H; Ohdan, H; Fudaba, Y; Irei, T; Tashiro, H; Itamoto, T; Asahara, T (2006): Near-Infrared spectroscopic analysis of hemodynamics and mitochondrial redox in right lobe grafts in living-donor liver transplantation. *Am J Transplant* 6 (4), 797–805.

- [61] Mittmeyer, HJ (1971): Über das Auftreten punktförmiger Blutaustritte in Totenflecken (Vibices). *Z Rechtsmed (Zeitschrift für Rechtsmedizin)* 69 (4), 263-269.
- [62] Payne-James, R (2005): Carbon monoxide poisoning. Clinical findings, sequelae. In: *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, Elsevier, 301-319.
- [63] Pingoud, A; Urbanke, C (1997): *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin, New York: W. de Gruyter (De Gruyter Lehrbuch), 155.
- [64] Püschel, K; Klein, A; Block, R; Stimpfl, T (2008): Kohlenmonoxidintoxikation. Eine Elster (im Schornstein) brachte den Tod. *Rechtsmedizin* 18 (5), 392-396.
- [65] von Rappard, J; Schönenberger, M; Bärlocher, L (2014): Carbon monoxide poisoning following use of a water pipe/hookah. *Deutsches Arzteblatt international* 111 (40), 674–679.
- [66] Schäfer, AT (2000): Colour measurements of pallor mortis. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 113 (2), 81-83.
- [67] Scheeren, TWL; Schober, P; Schwarte, LA (2012): Monitoring tissue oxygenation by near infrared spectroscopy (NIRS): background and current applications. *J Clin Monit Comput* 26 (4), 279-287.
- [68] Schmidt, RF; Thews, G (1983): *Physiologie des Menschen*. 21st ed. Berlin, Heidelberg [etc.]: Springer-Verlag; 535-545.
- [69] Schmidt, W (2000): *Optische Spektroskopie. Eine Einführung*. 2. Auflage. Weinheim, New York, Chichester: Wiley-VCH, 164, 288-295, 316-318.
- [70] Schmitt, A (1977): Bestimmung der Gesamtporphyrine in Urin durch Derivativ-Spektroskopie. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 15 (1-12), 303-305.



- [71] Scholz J (2014): Untersuchungen zur morphologischen und farblichen Entwicklung von Leichenflecken. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Hamburg. Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Eppendorf [online im Internet] URL: <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2014/6639/pdf/Dissertation.pdf> [abgerufen am 18.07.2016].
- [72] Schulz, K (2009): Spektrometrische Untersuchungen zur Reoxygenierung des Hämoglobins in Totenflecken bei postmortaler Kälteexposition. Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität Freiburg, Freiburg. Institut für Rechtsmedizin. [online im Internet] URL: <https://freidok.uni-freiburg.de/data/6578> [abgerufen am 16.03.2013].
- [73] Schütz, H; Machbert, G (1988): Photometrische Bestimmung von Carboxy-Hämoglobin (CO-Hb) im Blut. Weinheim, Bundesrepublik Deutschland: VCH Verlagsgesellschaft, 10, 72-88, 98.
- [74] Schwerd, W (1961b): Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. Nachweis, gerichtsmedizinische und toxikologische Bedeutung. Lübeck: Schmidt-Römhild, 15, 73-80, 98-120.
- [75] Sebbane, M; Claret, P-G; Mercier, G; Lefebvre, S; Théry, R; Dumont, R et al. (2013): Emergency department management of suspected carbon monoxide poisoning: role of pulse CO-oximetry. *Respiratory care* 58 (10), 1614-1620.
- [76] Smesny, S; Riemann, S; Riehemann, S; Belleman, ME; Sauer, H (2001): Quantitative Messung induzierter Hautrötungen durch optische Reflexionsspektroskopie – Methodik und klinische Anwendung. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 46 (10), 280-286.
- [77] Sully, CJ.; Walker, GS; Langlois, NEI (2018): Investigation into the potential for post-mortem formation of carboxyhemoglobin in bodies retrieved from fires. *Forensic Sci Med Pathol* 14 (3), 342-348.

- [78] Taillefer, MC; Denault AY (2007): Cerebral near-infrared spectroscopy in adult heart surgery: systematic review of its clinical efficacy. Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE).
- [79] Tomita, M; Ohtomo, M; Suzuki, N (2006): Contribution of the flow effect caused by shear-dependent RBC aggregation to NIR spectroscopic signals. *NeuroImage* 33 (1), 1-10.
- [80] Torrecilla, JS; Vidal, S; Aroca-Santos, R; Wang, SC; Cancilla, JC (2015): Spectroscopic determination of the photodegradation of monovarietal extra virgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems. *Talanta* 144, 363-368.
- [81] Tsokos, M (2005a): Postmortem Changes. Overview. In: Payne-James J (Hrsg.) *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, 456-476.
- [82] Tsokos, M (2005b): Forensic pathology reviews. Volume 3. Totowa, N.J., 183-238
- [83] Usumoto, Y; Hikiji, W; Sameshima, N; Kudo, K; Tsuji, A; Ikeda, N (2010): Estimation of postmortem interval based on the spectrophotometric analysis of postmortem lividity. *Legal Medicine* 12 (1), 19-22.
- [84] Vanezis, P; Trujillo, O (1996): Evaluation of hypostasis using a colorimeter measuring system and its application to assessment of the post-mortem interval (time of death). *Forensic Science International* 78 (1), 19-28.
- [85] Vanezis, P (1991): Assessing hypostasis by colorimetry. *Forensic Science International* 52 (1), 1-3.
- [86] Vevelstad, M; Morild, I (2009): Lethal methemoglobinemia and automobile exhaust inhalation. *Forensic Sci Int* 187 (1-3), e1-e5.

- [87] Walther, R (2004): Reflexionsspektroskopie zur Charakterisierung optisch trüber Medien: Modellierung, Simulation und statistische Datenanalyse. Universität Freiburg. Fakultät für Mathematik und Physik [online im Internet] URL: <https://www.freidok.uni-freiburg.de/data/1309> [abgerufen am 19.07.2019].
- [88] Wang, L; Jacques, SL.; Zheng, L (1995): MCML- Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 47 (2), 131-146.
- [89] Watchman, H; Walker, GS; Randeberg, LL; Langlois, NEI (2011): Re-oxygenation of post-mortem lividity by passive diffusion through the skin at low temperature. *Forensic Sci Med Pathol* 7 (4), 333-335.
- [90] Weng, S; Dong, R; Zhu, Z; Zhang, D; Zhao, J; Huang, L; Liang, D (2018): Dynamic surface-enhanced raman spectroscopy and chemometric methods for fast detection and intelligent identification of methamphetamine and 3, 4-Methylenedioxy methamphetamine in human urine. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 189, 1-7.
- [91] Wülker, M; Böhrer, K; Bohnert, M; Liehr, AW (2012): A robot-based measurement system for the reflectance-spectroscopic characterization of livores mortis. 9th France-Japan & 7th Europe-Asia Congress on Mechatronics (MECATRONICS) / 13th Int'l Workshop on Research and Education in Mechatronics (REM). Paris, France, 313-318.
- [92] Zeeck, A (2017): *Chemie für Mediziner*, 9. Auflage, Elsevier Verlag, 427-440

## **VIII Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Püschel danke ich für die Vergabe des Themas und die Unterstützung. Ich danke meinen Betreuern, Frau Dr. med. Carolin Edler und Herrn Prof. Dr. med. Sven Anders für die Betreuung, die Geduld, die vielen wertvollen Hinweise und Ratschläge und die Zuversicht über die gesamte Zeit.

Der Firma DERMALOG danke ich für die Herstellung und Überlassung des Spektrometers.

Ich danke weiterhin dem Team der Anmeldung und den Prosektoren, sowie dem Team der Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin am UKE Hamburg für die Kooperation zu jeder Tages- und Nachtzeit. Herrn Dr. Pinnschmidt danke ich für die wertvollen Ratschläge. Weiterhin danke ich meiner Schwester für die Korrekturen und die mentale Unterstützung, sowie meiner restlichen Familie und meinen Freunden für ihre mentale Unterstützung.

## **IX      Lebenslauf**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

## **X Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....  
Berit Staak Ridder

