

*Aktuelne teme/
Current topics*

PROMENA KONCENTRACIJE ETANOLA U
POST MORTEM UZORCIMA KRVI

ETHANOL CONCENTRATION CHANGES IN
POST MORTEM BLOOD SAMPLES

Correspondence to:

Marko Antunović

Centar za kontrolu trovanja,
Vojnomedicinska akademija, Beograd
Crnotravnska 17, Beograd
Tel. 00381652430700
E-mail: antunovic.marko87@gmail.com

Marko Antunović¹, Branislava Rusić¹, Kristina Denić¹,
Snežana Đorđević¹, Marko Mitić², Gordana Tomašević²,
Vladimir Nešić¹, Vesna Kilibarda¹

¹ Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

² Institut za patologiju i sudsku medicinu, Vojnomedicinska akademija,
Beograd

Sažetak

Alkohol kao jedna od najviše upotrebljivanih psihoaktivnih supstanci je čest uzrok smrti, pa se i nalazi na vrhu liste po brojnosti analiza u post mortem toksikologiji. Rezultati forenzičkih ispitivanja imaju veliki sociomedicinski značaj, stoga je neophodno obezbediti tačne i pouzdane podatke. Analitičke metode za određivanje alkohola u krvi do danas su doveđene do savršenstva, međutim utvrđivanje koncentracije etanola u krvi preminule osobe u trenutku kada je nastupila smrt, zahteva mnogo više truda. Najznačajniji uzroci lažno visokih rezultata su: difuzija etanola u krv iz drugih tkiva kao i *in vitro* produkcija dejstvom različitih mikroorganizama. U našem radu pokazano je višestruko povećanje koncentracije etanola u uzorcima *post mortem* krvi nakon određenog vremena. Vrednosti porasta koncentracije kreću se u rasponu od 33 do 4319%. Kako postoji mnogo faktora koji utiču na koncentraciju etanola u *post mortem* uzorcima, izuzetno je važno individualno posmatrati svaki uzorak, kako bi se došlo do pravilnog zaključka da li je preminula osoba bila pod uticajem etanola u trenutku smrti.

Ključne reči

ethanol, post mortem krv, sudska medicina

Key words

ethanol, post mortem blood, forensic
medicine

UVOD

Analitička toksikologija je često u vezi sa pravnim ili sudskim aspektima toksikologije, kada treba utvrditi eventualni uzrok smrti koja je posledica intoksikacije. Forenzička toksikologija u sudsko medicinskoj praksi ima veliki značaj. Najvažniji zadatak sudskog (forenzičkog) toksikologa u postmortem ispitivanjima jeste kvalitativna i kvantitativna analiza otrova ili leka u biološkim uzorcima kao i interpretacija dobijenih rezultata¹. U velikom broju slučajeva, rezultati ovih analiza verovatno će biti korišćeni u sudskim postupcima, stoga je neophodno obezbediti pouzdane, tačne i validne podatke.

Upotreba alkohola oduvek je bila široko rasprostranjena u svetu, te je zbog toga i čest uzrok smrti. Određivanje koncentracije alkohola u krvi (AUK) jedna je od najčešće izvođenih analiza u sudskoj praksi². Kada je to potrebno, toksikolog-analitičar može biti pozvan na sud kao sudski veštak, gde daje stručno mišljenje i objašnjava dobijene rezultate. Do danas, razvijene su analitičke tehnike za određivanje alkohola u biološkim uzorcima koje daju veoma pouzdane rezultate. Gasna hromatografija sa headspace tehnikom (HS GC) koristi se kao referentna i rutinska meto-

da. Smatra se da je preanalitička faza najveći izvor grešaka i još uvek je aktuelni problem za analitičare u svim laboratorijama. Kvalitet, uslovi čuvanja i priprema uzorka za analizu imaju presudan uticaj na tačnost dobijenih rezultata³.

Zbog činjenice da etanol u *post mortem* uzorcima može biti različitog porekla, precizna interpretacija koncentracije etanola u krvi, u trenutku smrti, predstavlja težak zadatak za analitičara. Kao mogući izvori etanola u *post mortem* uzorcima krvi navode se : ingestija etanola i endogena produkcija pre nastanka smrti, difuzija etanola iz GIT-a kao i *in vitro* produkcija etanola dejstvom različitih mikrobioloških agensa⁴. Poslednji način stvaranja etanola navodi se kao najkritičniji faktor koji komplikuje tumačenje dobijenih rezultata. Brojni radovi navode da ovako sintetisan etanol, može biti uzrok povećanja koncentracije, kao funkcija prisustva broja i vrste mikroorganizama (MO) prisutnih u materijalu koji se analizira⁵.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi promena koncentracije etanola u *post mortem* uzorcima krvi, kroz određeni vremenski period i navedu mogući faktori koji utiču na tu promenu.

MATERIJAL I METODE

Materijal: post mortem krv.

Metoda: Gasna hromatografija sa head space dodatkom.

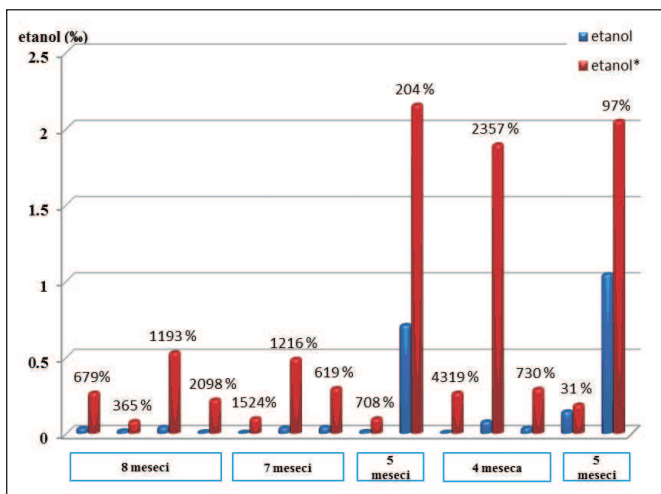
Radni uslovi gasnog hromatografa: Temperatura injektora 150°C, protok gasa nosača 2 mL/min, temperatura FID detektora 240°C. Kolona: Rtx-BAC1 Silikacapillary column, 30m x 0,32 mm ID, debljina filma 1,8 µm.

Priprema uzoraka: u bočicu za head-space pipetira se 200 µL rastvora uzorka i 200 µL internog standarda (izopropanol) koncentracije 1%. Bočica se greje u Dani HSS 86,50 grejaču, 5 minuta, a nakon toga injektuje 10 µL gasne faze u injektor gasnog hromatograma.

REZULTATI

Tabela 1. Prikaz promene koncentracije etanola u uzorcima u zavisnosti od vremena

etanol (%)	etanol* (%)	Promena (%)
0.034	0.265	679
0.017	0.079	365
0.041	0.53	1193
0.01	0.2198	2098
0.006	0.0974	1524
0.0370	0.4870	1216
0.0410	0.2950	619
0.0120	0.0970	708
0.7090	2.1519	204
0.0060	0.2651	4319
0.0770	1.8923	2357
0.0350	0.2905	730
0.1430	0.1869	31
1.0410	2.0469	97



Slika 1. Grafički prikaz promene koncentracije etanola u zavisnosti od vremena koje je proteklo između dva određivanja (etanol*-koncentracija etanola posle drugog određivanja)

U radu je razmatran porast koncentracije etanola u *post mortem* uzorcima krvi u različitom vremenskom periodu. Pre drugog testiranja epruvete sa uzorcima čuvane su u frižideru na +4°C. U datoj tabeli prikazana je promena koncentracije etanola u zavisnosti od perioda koji je prošao između dva testiranja. Prikazani rezultati pokazuju značajno povećanje koncentracije etanola, a razlike u vrednostima

kreću se u rasponu od 33 do 4319%.

DISKUSIJA

Zbog svoje široke upotrebe i prekomerne konzumacije, alkohol ima značajnu ulogu u smrtnim slučajevima čiji je uzrok korišćenje psihoaktivnih supstanci. Alkohol tj. etanol se nalazi na vrhu liste po brojnosti analiza u *post mortem* toksikologiji, i zbog toga, analiziranje uzoraka kao i interpretacija dobijenih rezultata predstavlja značajan deo posla svake laboratorije koja se bavi toksikološkim i forenzičkim ispitivanjima⁽⁶⁾.

Kvalitativna i kvantitativna analiza etanola u svim biološkim uzorcima danas je relativno jednostavna procedura koja obezbeđuje pouzdane rezultate. Međutim, interpretacija rezultata i donošenje tačnih zaključaka o koncentraciji etanola u krvi, u trenutku smrti, zahteva mnogo više truda. Analitičari često citiraju izreku: „rezultat analize je dobar koliko i uzorak koji je primljen” što ukazuje na važnost preanalitičke faze, posebno u forenzičkim ispitivanjima⁽⁷⁾.

Kao najvažniji faktori koji u velikoj meri mogu uticati na dobijeni rezultat navode se:

- stanje tela umrle osobe
- vreme proteklo između smrti i obdukcije
- uslovi čuvanja i kvaliteta uzorka
- etanol sintetisan *in vitro*, dejstvom MO u procesu fermentacije glukoze, što je posebno izraženo kod leševa kod kojih je došlo do procesa raspadanja⁽⁴⁾.

U *post mortem* toksikologiji praksa je da se svi rezultati manji od 0,1‰ (0,1 mg/L) proglašavaju kao negativni (što je često i vrednost limita kvantifikacije rutinskih HS GC metoda). Iz prikazanih rezultata se vidi, da uzorci koji su proglašeni kao negativni posle prvog određivanja, imaju značajno više koncentracije etanola nakon određenog vremenskog perioda, što se slaže sa rezultatima nekoliko drugih autora u kojima je dokazan porast koncentracije etanola u *post mortem* uzorcima krvi u zavisnosti od vremena⁽⁵⁾.

Prisustvo mikroorganizama utiče na promenu koncentracije etanola, što je i pokazano u radu Yajima i saradnika⁽⁵⁾. Ubrzo nakon smrti, usled narušenog integriteta ćelija i tkiva, dolazi do širenja bakterija iz GIT-a u skoro sve delove tela⁽⁸⁾. Glukoza i ostali ugljeni hidrati služe kao supstrat različitim mikroorganizmima, pri čemu dolazi do produkcije više vrsta alkohola, a u najvećoj meri etanola.

U ovakvim slučajevima svakako treba razmotriti korišćenje alternativnih uzoraka u evaluaciji koncentracije etanola u krvi. Poređenje vrednosti etanola u krvi, urinu i očnoj vodici može biti značajno za utvrđivanje pitanja da li je osoba bila pod uticajem alkohola u trenutku smrti. Praksa je da se, kad god je to moguće, zajedno sa određivanjem u krvi vrši i analiza koncentracije etanola u urinu. Kako urin sadrži najveći procenat vode, predstavlja koristan uzorak za određivanje koncentracije etanola. Rizik od invazije MO u mokraćnu bešiku nakon smrti je manji nego što je to slučaj kod krvi i ostalih tkiva. Takođe, u urinu zdravih osoba minimalno je prisustvo glukoze i ostalih ugljenih hidrata koji su glavni supstrat za *post mortem* sintezu etanola. Imajući u vidu ove činjenice, treba strogo povesti računa pri analiziranju uzoraka preminulih koji su imali dijabetes ili druge bolesti kod kojih je u urinu prisutna visoka koncentracija

ugljenih hidrata⁽⁹⁾. Takođe, jedno od mogućih rešenja bilo bi korišćenje epruveta sa dodatkom NaF (1-2%). Ova supstanca se koristi kao konzervans i deluje tako što inhibira enzim enolazu koji učestvuje u procesu metabolizma glukoze. Ovakav postupak uzorkovanja bi u velikoj meri sprečio dalju produkciju etanola, ukoliko se uzorak ne analizira odmah nakon obdukcije⁽⁵⁾.

U prikazanim rezultatima može se primetiti da najveći porast koncentracije etanola postoji kod uzoraka kod kojih je koncentracija etanola bila minimalna (0.006 – 0.07 ‰), što se možda može dovesti u vezu sa mikrobiološkom aktivnošću i masivnom *in vitro* produkcijom etanola (porast koncentracije etanola za 1193- 4319 ‰).

ZAKLJUČAK

In vitro produkcija etanola u post mortem uzorcima biološkog materijala još uvek predstavlja aktuelan problem. Iako je nemoguće izbeći sve interferirajuće faktore u preanalitičkoj fazi, veoma je važno uzeti ih u razmatranje pri interpretaciji dobijenih rezultata. U ovom radu pokazano je da naknadna produkcija i porast koncentracije etanola u nekim uzorcima može iznositi i preko 4000%. Imajući u vidu ovu činjenicu, izuzetno je važno individualno posmatrati svaki uzorak, kako bismo došli do pravilnog zaključka da li je preminula osoba bila pod uticajem etanola u trenutku smrti.

Abstract

Alcohol as one of the most of used psychoactive substances is a common cause of death and also tops the list of most frequent analysis in post mortem toxicology. The results of forensic tests have socio-medical significance, and therefore it is necessary to provide accurate and reliable data. Analytical methods for the determination of alcohol in the blood now had been brought to perfection, however, determine the concentration of ethanol in the blood of the deceased at the moment of death and require much more effort. The most important causes of false high results are diffusion of ethanol in blood from other tissues and *in vitro* production by the influence of various microorganisms. In this study it has been shown that concentrations of ethanol in postmortem blood samples over time has significant increase rate. Increase of the concentration values ranging from 33 to 4319 ‰. As there are a lot of factors that could affect the concentration of ethanol in postmortem samples, it is extremely important to observe each sample individually, in order to come to a correct conclusion if deceased was under the influence of ethanol at the time of death.

LITERATURA

¹ Jokanović M. Toksikologija, Elit-Medica, Beograd 2010.

² Girasek D, Gielen A, Smith G, Alcohol's contribution to fatal injuries: a report on public perceptions, 2002, Ann. Emerg. Med. 39(6): 622–630.

³ Skopp G. Preanalytic aspects in post-mortem toxicology. 2004, Forensic Sci Int, 142(2-3):75-100.

⁴ Ziavrou K, Boumba VA, Vougiouklakis TG. Insights into the origin of postmortem ethanol. 2005, Int J Toxicol., 24(2):69-77.

⁵ Yajima D, Motani H, Kamei K, Sato Y, Hayakawa M, Iwase H, Ethanol production by *Candida albicans* in postmortem human blood samples: effects of blood glucose level and dilution, 2006, Forensic Sci. Int. 164(2-3): 116–121.

⁶ Perola M, Vuori E, Penttilä A, Abuse of alcohol in sudden out-of hospital deaths in Finland, 1994, Alcohol Clin. Exp. Res. 18(2): 255–260.

⁷ Forrest A, Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses, 1993, J. Clin. Pathol. 46(8): 292–296.

⁸ Behnouth B, Bazmi E, Akhgari M, Hashemi Nazari S, Sardari Iravani F, Evaluation of Ethanol and N-propanol in Victims, 2010, IJT, 4(3): 311-314

⁹ I.B. Collison, Elevated postmortem ethanol concentrations in an insulindependent diabetic, 2005, J. Anal. Toxicol. 29(7): 762–764.