

THE INFLUENCE OF *POST-MORTEM* CHANGES IN BIOLOGICAL MATERIAL ON INTERPRETATION OF TOXICOLOGICAL ANALYSIS RESULTS

Maria KAŁA, Ewa CHUDZIKIEWICZ

Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: Investigation on *post-mortem* changes in biological material have been carried out in the Institute of Forensic Research for about forty years. The studies covered a broad spectrum of aspects. In particular were investigated:

- physico-chemical characteristics of putrefactive biological material;
- courses and conditions of putrefaction processes influenced the formation of toxic substance, especially ethanol, n-butanol, carboxyhaemoglobin and cyanides;
- decay processes of endogenous substances, important to toxicological examinations, e.g. esterase activity;
- degradation processes of exogenous substances, as follows: decomposition of esters, stability of strychnine, instability of thioridazine and imipramine etc;
- representations of putrefactive biological material relative to the methods being used to toxic substances isolation and detection.

The results obtained by authors from Institute were compared with those described in the literature. Investigating the above processes enables us to understand the so-called biological background, which should be taken into account in the selection of analytical methods and forensic interpretation of toxicological analysis results.

KEY WORDS: *Post-mortem* changes, endogenous and exogenous compounds, formation and degradation processes.

Problems of Forensic Sciences, vol. LIV, 2003, 32–59

Received 14 November 2003; accepted 23 December 2003

INTRODUCTION

Biochemical processes, which are strictly controlled in the living organism, can be changed drastically in the course of disease. The mere course of agony can influence the concentrations of many substances (e.g. decrease of glucose concentration) which had occurred in living organism in normal levels. Cardiac arrest, respiratory arrest and stopping cerebral functions are definition of death. After this fact in the dead body all processes veer towards thanatochemical changes.

Within a few hours of death the blood within the vascular system clots and simultaneously there is clot lysis. The effectiveness of the clot lysis will determine whether a blood samples obtained at autopsy is clotted, or completely fluid, or partly clotted and partly fluid. The fibrin clots invariably entrap large numbers of red blood cells so that the resulting clot is relatively red cell rich and serum poor. Occasionally the heart and great vessels may contain a large two-layered clot - the lower part typically red clot and the upper part pale yellow rubbery clot largely devoid of red cells. Consequently blood samples obtained at autopsy are variable in their red cell and protein content and these have some influence on the measured water-soluble substance, e.g. ethanol concentrations. Blood obtained from limb vessels is most likely to be fluid and largely devoid of clots and therefore provides as homogeneous a sample for analysis as can be hoped for. The presence of blood clots in themselves do not influence the accuracy of blood alcohol analysis using headspace gas chromatography [45].

In the early phase of *post-mortem* decomposition, the dead body is exposed to autolysis, i.e. dissolution of organs under the impact of endogenous enzymes. Parallel to that putrefaction is begun mainly by reductive processes due to the action of endogenous and exogenous bacteria and their enzymes (e.g. *Staphylococcal* species are known to elaborate powerful protease enzymes) and decay, based on oxidative reactions. Body tissues remain bacteriologically sterile from exogenous infection for at least 20 hours after death [38, 41]. But the transmigration of normal microbiota (selected bacterial and mycotic organisms) through the wall of the small intestine occurs within 2 to 3 h at 37°C, 5 to 6 h at 25°C, and 72 h at 4°C [34].

Transformation and degradation of the well-known body structures (e.g. enzymatic digestion of cell components and membranes), together with accumulation of bacterial metabolites are likely to generate a huge range of new chemical compounds. On the other hand these factors and conditions may also cause decomposition of many exogenous compounds toxicologically relevant which were taken before death. Moreover cell autolysis and the putrefactive process participate in *post-mortem* redistribution of drugs, that means site- and time-dependent variations in *post-mortem* drug concentrations which may occur immediately after death by passive drug release from drug reservoirs (gastrointestinal tract, liver, lungs) [42].

Direction and intensity of time-related *post-mortem* decomposition depend on several factors, among them are the physical condition of the dying person (corpulence, age), pre-mortem diseases, injuries, mechanisms of death and effects of poisons or medicaments. Of great importance is the influence of environmental effects to which the corpse is exposed. Moreover, there are organ-related differences between decomposition processes in single corpses. They are connected with an organ enzyme content and with or-

gan position. The aerobic processes on the surface are faster than anaerobic processes in the interior. Blood and tissue samples stored in vessels undergo similar decomposition processes [48].

It is often assumed that the freezing of biological samples is the ideal method for preservation of drugs. This may be so for many compounds, but there are some notable exceptions, particularly easily oxidised compounds, such as phenothiazines. For example, if plasma containing chlorpromazine was frozen, stored at -20°C and thawed, the compound was recovered intact. However, if the same process was applied to a blood sample obtained from a case of chlorpromazine ingestion, then the actual plasma concentration of the parent drug was doubled during the freezing and thawing cycle due to the reduction of sulphoxide and N-oxide metabolites back to the parent compound. Similarly, measurements of the drug after 18 day storage at 4°C also reveals an increase in the chlorpromazine plasma concentration [14].

Results of the studies on *post-mortem* changes in biological material which were carried out in the Institute of Forensic Research in Cracow are presented and discussed in the present paper. The results were compared with recent findings existing in the literature.

CHANGES IN HYDROGEN ION EXPONENT AND REDOX POTENTIAL

The studies of *post-mortem* changes in biological material have been carried out in the Institute of Forensic Research in Cracow for about forty years. The initiator of them was the professor Jan Markiewicz of longstanding director of the Institute.

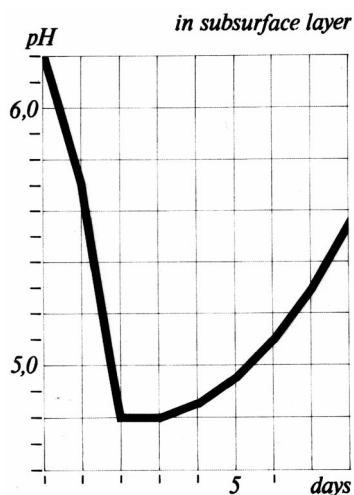


Fig. 1. The changes in pH of blood samples in subsurface layer.

This author examined factors that condition and control the processes of biochemical reactions in biological material, namely the hydrogen ion exponent and redox potential of a blood sample collected and secured in a vessel [32]. The author found out that the hydrogen ion exponent of a blood sample stored *in vitro* changed just as it did in tissues of decaying cadaver. These changes were particularly rapid in the subsurface portion to which atmospheric oxygen diffuses readily. Within a few days the blood underwent a strong acidification,

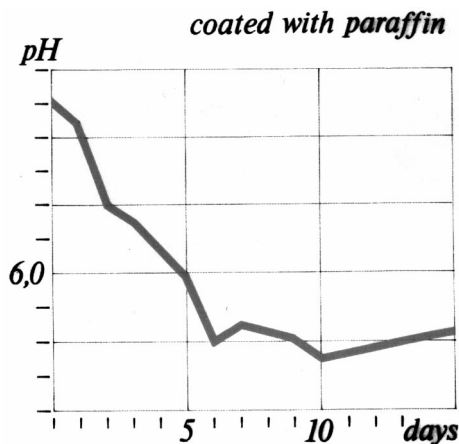


Fig. 2. The changes in pH of blood samples coated with paraffin.

inorganic phosphates. Later on many acids and bases (e.g. ammonia from decomposition of amino acids) arise during putrefactive processes what resulted in increasing pH of biological materials.

The redox potential also showed characteristic changes, dependent, as in the case of pH, on the supply of oxygen. A dramatic initial drop was followed by a rise with a more or less distinct maximum and a rather slow fall, later. The maximum was distinct when oxygen had access to the blood (Figure 3). When the supply of oxygen was restricted, it was considerably lower and sometimes missing at all (Figure 4) [32]. The occurrence of a maximum, according to Hewitt [26] evidences the formation of peroxides in the biological material. Their presence may explain, among other things, the decline of a number of organic poisons in the blood and organs of cadavers. In the blood samples treated with an antiseptic – merthiolate – both the changes in pH and those in the redox potential were hardly perceptible.

FORMATION OF ENDOGENOUS ETHYL ALCOHOL

Another group of study was made on the conditions and the process of formation of toxic substances in the course of putrefaction.

The hypothesis that glucose may be the source of endogenic alcohol in the blood putrefying *in vitro* was verified in this group of studies [3]. Because of glycolysis and diffusion processes strongly differentiated levels of glucose, usually considerably exceeding the physiological ones, were observed in the blood sample collected at autopsy. In the course of decomposition of blood

even to a value below 5, and next the exponent rose gradually (Figure 1). In blood samples with a reduced oxygen supply, for instance, those coated with paraffin, or when measurements were taken at the bottom of the vessel, the changes in pH were slower and the hydrogen ion exponent as a rule lied inside the acid range (Figure 2).

Mechanisms responsible for the decrease in blood pH are complex. Hypoxia during the agonic processes is the first stage. Glycogen is, thus rapidly depleted, and this anaerobic process results in the accumulation of lactic acid and inor-

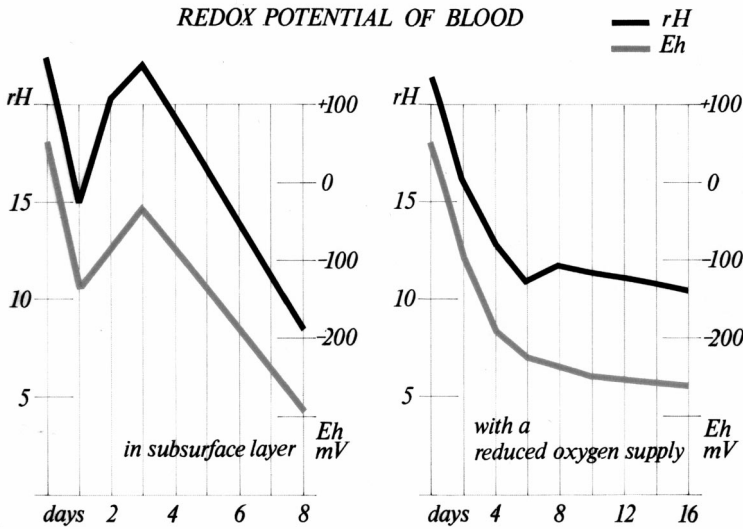


Fig. 3. Redox potential of blood in subsurface layer.

Fig. 4. Redox potential of blood with a reduced oxygen supply.

proceeding *in vitro*, a rapid breakdown of glucose was noted no later than three days. From the third day of study onwards alcohol began to appear in the blood, its level attaining the highest value on the 10th–12th day. If the initial concentration of glucose did not exceed the upper limit of normal physiological concentrations, the produced amount of alcohol nearly stoichiometrically agreed with the amount of glucose contained in the blood. With higher concentrations of glucose no such relationship was observed. If glucose was added to the blood in the course of blood putrefaction, the endogenous alcohol content increased noticeably, reaching concentrations even above 2‰ (Figure 5).

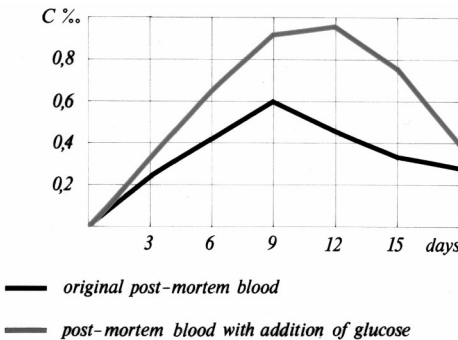


Fig. 5. The concentrations of endogenous ethanol in blood putrefying *in vitro*:
- original *post-mortem* blood,
- *post-mortem* blood with addition of glucose.

Nowadays we have known that the formation of ethyl alcohol after death is not so simple. Ethanol formation may occur in blood putrefying in a cadaver or in blood putrefying *in vitro*. Opponents of the fact that glucose is converted to alcohol after death argue that the glucose content of an unpreserved sample of blood disappears within a few hours, whereas alcohol production after death requires a minimum of several days and some bacterial presence [14]. According to O’Neal

and Polkis [39] *Escherichia coli* and *Candida albicans* are the primary causes of *post-mortem* ethanol synthesis, but there are 58 species of bacteria and 17 species of yeasts that can produce ethanol. The sites of greatest ethanol synthesis are the tissues with high glucose storage capacity because glucose is the primary substrate of *post-mortem* ethanol production. Bacterial production of ethyl alcohol is associated with the production of other volatile compounds such as methyl alcohol, formaldehyde, n-propyl alcohol, propionic acid, acetone, acetic acid, acetaldehyde, n-butyric acid and iso-butyric acid. Of these n-butyric acid and iso-butyric acid are said to be the most common associates of ethanol produced by putrefactive bacteria.

In establishing whether there is *post-mortem* production or in vivo ingestion of alcohol, circumstantial evidence and corroborative analyses of vitreous humour and urine is of considerable assistance. Vitreous humour is helpful because it is better protected from infiltration by the ethanol-producing bacteria of putrefaction. Urine is useful because it normally contains little or no substrate for bacterial conversion to ethanol. Therefore, single autopsy blood ethanol level is commonly uninterpretable without concurrent vitreous humour and urine ethanol levels as well as information gleaned from the scene of death and case history.

SOME OTHER VOLATILE COMPOUNDS

Methanol, which very often goes together with ethanol, a poison acting by its metabolites, can be also detected in corpses. It should be added that it occurs in living organism because it is endogenous substance. The origin of endogenous methanol remains unclear. It has been proposed that it derived from S-adenosylmethionine, that means biologically active methyl, in the pituitary [1] or from the breakdown of ethanol by the intestinal flora [46]. However, there are also findings to suggest that methanol is produced by metabolism in the liver [20]. The methanol that results from the hydrolysis of methyl ester side chains of pectin in the diet [19] cannot be regarded as truly endogenous, and it appears that it may exceed the true endogenous methanol many times over [19, 21, 22]. The levels of endogenous methanol are very low, ranging from 0.1–0.2 mg/kg (0.1mg/kg is the limit of quantification of the method used for its quantification) to 3.4 mg/kg [24]. These values are usually several orders of magnitude lower than methanol concentrations in poisonings. Mannitol administration just before death could favour *post-mortem* methanol, ethanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol synthesis [27].

During studies carried out in Institute of Forensic Research, interest was also taken in n-butanol as one of the products of the putrefactive fermentation of blood, relatively frequently appearing in the blood from cadavers

fished out of water [23]. A correlation was found between the concentration of n-butanol in blood samples taken from cadavers fished out of water and the time they had been staying in it. This correlation may constitute the basis of an empirical method for the determination of the time of death in the case of death by drowning (Figure 6).

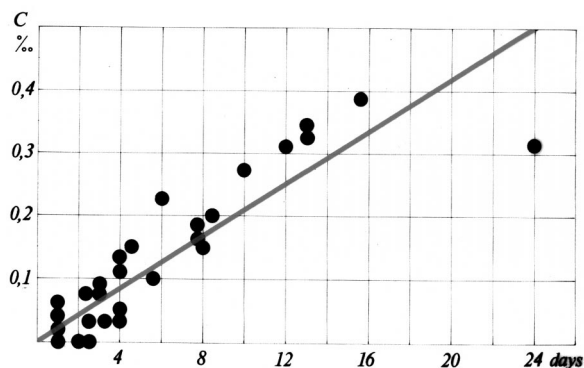


Fig. 6. Correlation between the concentration of n-butanol in blood samples taken from cadavers fished out of water and the time they had been staying in it.

HAEMOGLOBIN DERIVATIVES

The examination for the presence of different haemoglobin derivatives is an important factor for the medico-legal evaluation of the cause of death not only in fire victims. Carbonmonoxide derivative of haemoglobin (carboxyhaemoglobin, HbCO) occurs naturally in human organism in small quantities. It is the product of decomposition of haemoglobin in living organism. At first in this process heme group in haemoglobin undergoes hydroxylation by oxygenase at methine carbon atom C-5 and then, in not quite clear mechanism, this carbon atom is split off as carbon monoxide (which can be measured as HbCO). Simultaneously hemoglobin is converted into choleglobin (bile pigment) and HbCO are produced.

Besides sulphohaemoglobin, choleglobin is present in putrefied bodies. During the storage of *post-mortem* blood the decreasing activity of catalase favours the formation of choleglobin. When choleglobin is being formed, the readily detectable iron content increases and proportionally to the amount to the choleglobin produced at that. The change of haemoglobin into choleglobin resulted in the formation of carbon monoxide in the stored blood sample. Its presence caused the appearance of a putrefactively changed HbCO in the *post-mortem* blood sample within 24–48 hours. Further Markiewicz found that in blood putrefying under normal conditions HbCO might appeared *in vitro* in amounts reaching 5–7%. The maximum quantity

of HbCO in principle persisted for several days and next it broke down slowly. The appearance of HbCO in putrefying blood did not depend on the temperature at which the blood was stored within the limits of 2–37°C [31]. Significant quantitative differences in the occurrence of endogenous HbCO took place in the cases in which the *post-mortem* blood has been heated to a temperature of 65°C for at least 3 minutes [33]. Then the level of HbCO of endogenous origin might even exceed 30% for more than 10 days (Figure 7).

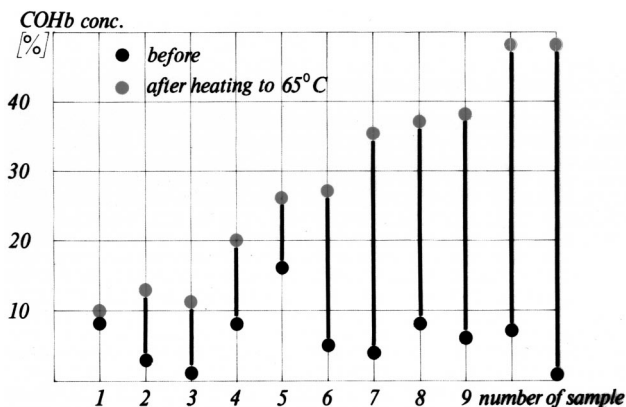


Fig. 7. The levels of endogenous HbCO in blood putrefying; before and after heating to 65°C.

All measurements were done by the two wavelength spectrophotometric method. According to Fechner et al. [18] HbCO content showed the stability against short heat even up to 75°C what is of great importance to the interpretation of the results obtained in tests for HbCO in the blood from cadavers of people died in fires. These authors found out that in *post-mortem* blood samples the formation of HbCO did not occur during storage and the determined by them HbCO levels of 1–2% could be due to methods error. An uncritical use of the two wavelength spectrophotometric method could give rise to simulated HbCO levels of the order of 20%. When measuring the HbCO level at one wavelength the presence of other Hb-derivatives results in a background spectrum, which can lead to a false positive interpretation of the results. One and two wavelengths spectrophotometric methods are therefore only applicable when the Hb derivatives – oxyhemoglobin (HbO) and HbCO alone are present. These are in agreement with results obtained by Oritani and Maeda [40] who estimated of HbCO contents in thermo-coagulated blood by a CO-oximeter system in comparison with gas chromatographic determination. Blood samples containing varied amounts of HbCO, experimentally prepared, were heated up to 75 and 80°C. HbCO measurements with the CO-oximeter showed “false” high values compared with

those before heating, whereas their total haemoglobin was reduced, showing that the elevation of HbCO depended on the decrease in total haemoglobin due to thermo-coagulation of other haemoglobin derivatives. Then, HbCO contents in the thermo-coagulated blood were estimated by correction considering the rates of decrease in total soluble haemoglobin. The estimated HbCO contents were slightly lower than the values before heating, but well correlated with the measurements by gas chromatography. Gas chromatographic determination also gave somewhat higher HbCO values in the heated samples.

Post-mortem blood samples showed also very changeable levels of methemoglobin (MetHb) during storage. When blood samples were heated, the normal red colour became more brownish and the samples developed a more viscous consistency. These changes increased over the first 3–4 days and the colour changed thereafter to a redder hue. There was observed an initial increase of MetHb level immediately after heating followed by a slow decrease [18].

ENDOGENOUS CYANIDE

The possibility of formation of cyanide ions in *post-mortem* blood is particularly important to the interpretation of the results of analyses for the cyanide content. Nedoma [36] found out that at the time of putrefaction occurring at room temperature and at free access of air cyanogen ions may arise in the blood in quantities (up to 80 mg/l) encountered in cases of acute fatal cyanide poisoning. They were not formed in blood samples in which putrefaction proceeded without access of air (Figure 8). Both, cyanide introduced into

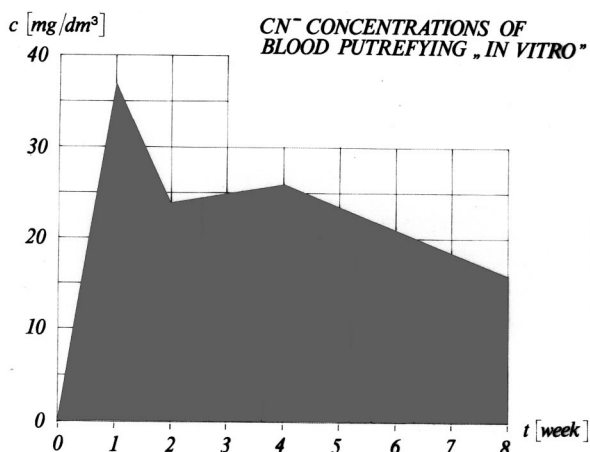


Fig. 8. Cyanide concentrations of blood putrefying *in vitro*.

blood from outside and that produced during the process of putrefaction turned into thiocyanate irrespective of the fact whether the blood underwent putrefaction with or without access of air. The level of generated thiocyanate did not lower for three months (Figure 9).

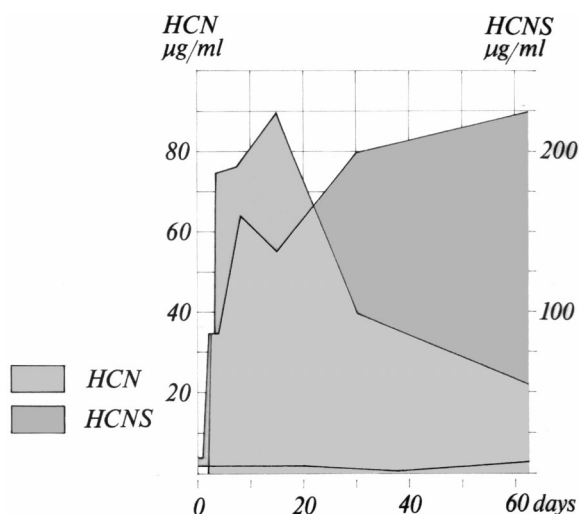


Fig. 9. The formation and the changes in cyanide (HCN) and thiocyanate (HCNS) concentrations in blood putrefying *in vitro* with access of air.

anide production in a duplicate sample. In further work by the same authors on out of date transfusion bloods stored for 2 months at room temperature, very high levels of the order of 100 mg/l were observed. Lokan et al. [30] described three cases of sudden death where high blood cyanide levels were found in routine toxicological screening of 331 cases at *post-mortem* but where the circumstances tended to preclude cyanide poisoning and where no source of cyanide could be discovered. These data suggest that the phenomenon occurs only infrequently. Up to now no substantive explanation can be found to account for the production of the very high blood cyanide levels found in some *post-mortem* blood samples. Endogenous thiocyanate in blood can be converted *in vitro* to cyanide under slightly acid conditions catalysed by haemoglobin and artefactually as the results of acidifying blood prior to analysis. In any event, thiocyanate is unlikely to be the source of the observed endogenous cyanide as normal blood thiocyanate levels rarely exceed 12 mg/l even in smokers. It is therefore of some interest to speculate on the possible involvement of microorganisms, a variety of which may invade the vascular system after death either from endogenous sources or by introduction from the autopsy environment. Cyanide production in the form of cyanoglucosides is well established in higher plants. Microbial cyanogenesis has also been demonstrated but appears to be more prevalent in fungi than bacteria. Experimentally, substantial production of cyanide by several species of *Pseudomonas* bacteria occurred only on particular culture media and under specific growth conditions. The yield of cyanide was maximal at about

In two reported *post-mortem* cases where cyanide was encountered apparently as the result of *post-mortem* production, the maximum blood level found was 1–2 mg/l. In contrast, one *post-mortem* blood sample was found to have increased in cyanide concentration from about 3 mg/l to 40 mg/l after 12 weeks storage [15]. Fluoride completely inhibited cy-

the beginning of the stationary phase of growth some 12–24 hours after inoculation, further incubation producing no additional cyanide [30]. Ballantyne [2] describes a significant decrease in cyanide concentration with time in *post-mortem* blood and tissues (lungs, brain, liver, and kidneys) of rabbits killed with potassium cyanide. This may be due to the metabolisation of cyanide to thiocyanates, but the bacteria involved are unknown.

RESULTS OF ENZYMES ACTIVITY IN *POST-MORTEM* MATERIAL

An investigation on the breakdown of the endogenous substances important to toxicological studies included the determination of acetylcholinesterase activity in blood, brain and liver and also its relationship with the concentrations of haemoglobin. It was found that the activity of this enzyme determined in the blood (obtained from living persons or from cadavers) did not undergo changes for at least 60 days when stored in a refrigerator (Figure 10). Similar results obtained for brain tissues, when the samples for study come from the homogenate of a whole brain or at least its whole hemisphere. However, the activity of the enzyme decreases successively when stored at room temperature and its fall a more or less characteristic course according to the kind of material examined [8, 25].

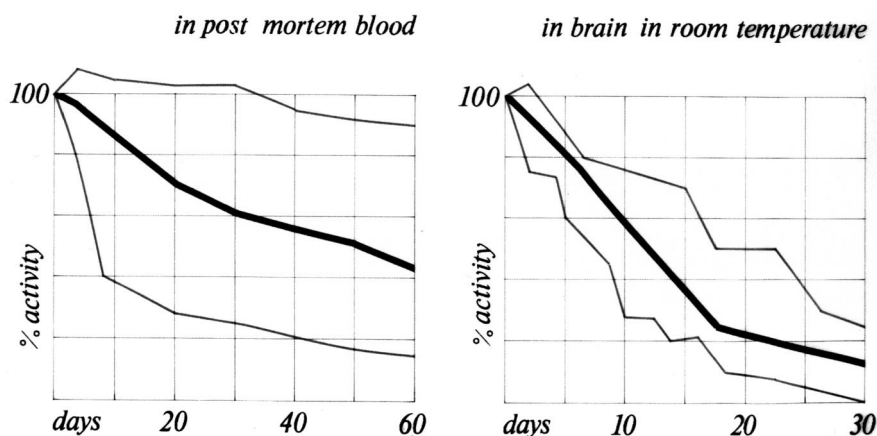


Fig. 10. Decrease of the acetylcholinesterase activity in *post-mortem* blood.

In the blood derived from living persons the activity of the enzyme virtually did not change in the first 8 days and next it dropped. In the blood taken from a cadaver acetylcholinesterase activity showed no essential changes in the first 4 days of storage. In brain the activity of acetylcholinesterase subsides progressively and relatively regularly. On the other hand, the activity of

cholinesterase in liver at the time of spontaneous putrefaction was very variable and hard to interpret: neither homogenization nor temperature had any effect on the course of changes in the activity of this enzyme in liver [25].

A close relationship was however found between the acetylcholinesterase of erythrocytes and the concentration of haemoglobin, but only in the first several days following death and blood sampling. This is particularly important, since haemoglobin of the blood from cadavers shows a considerably greater quantitative differentiation than it does in the case of the blood from living persons [8, 25].

In study by Chłobowska [11], on the breakdown of exogenous substances attention was given to that of esters of higher alcohols in biological material. The composition rate of acetates was highest in liver samples and markedly smaller in lung and brain samples. This decay was caused chiefly by the action of enzymes – esterases. Their inactivation by means of organophosphorus compounds inhibited it completely. The breakdown rate of acetates rose with the increasing length of the alkyl chain (Figure 11).

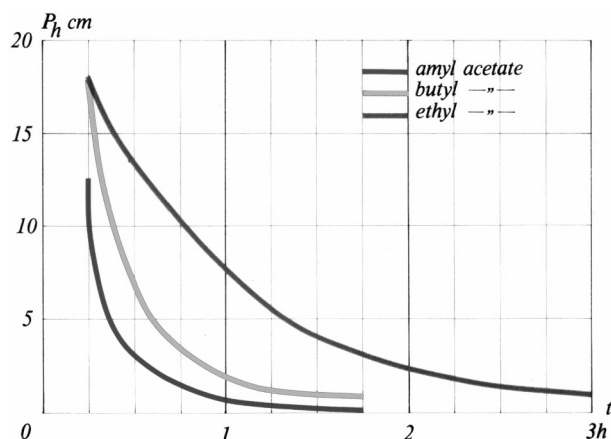


Fig. 11. Decomposition of higher alcohol acetates in *post-mortem* liver.

The possibility of a *post-mortem*, residual enzymatic activity was confirmed by study describing the *post-mortem* metabolism of dichlorvos by hepatic and plasmatic esterases [35]. Other authors [47] studied the *post-mortem* changes in drug-metabolising enzymes in rat liver microsomes. The results demonstrated that the activity of the liver enzymes did not stop immediately after death, but showed a progressive decrease during the first 48h *post-mortem*. A residual enzymatic activity, variable with the nature of the enzymes involved, is likely during the first hours after death.

These results underline the necessity of assaying the metabolites of the drugs in order to establishing the parent drug.

ANALYTICAL METHODS AND BIOLOGICAL MATRICES

In order to study the biological background in the detection of volatile poisons different methods of isolation and detection were applied.

The pictures of the volatile products of the decaying samples of liver, brain and lungs were built up (Fig. 12) with the help of distillation, extraction and the head space method for isolation (Fig.13) and gas chromatography with a flame ionization detection (GC-FID) for their detection [37].

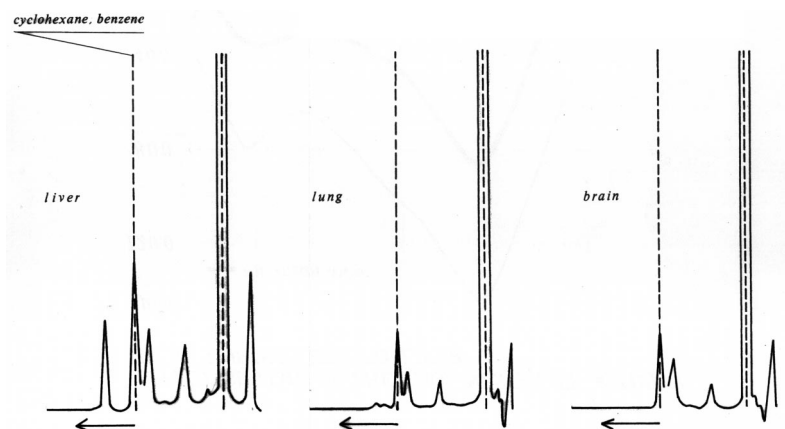


Fig. 12. The chromatograms of different biological materials after 4 weeks of putrefaction.

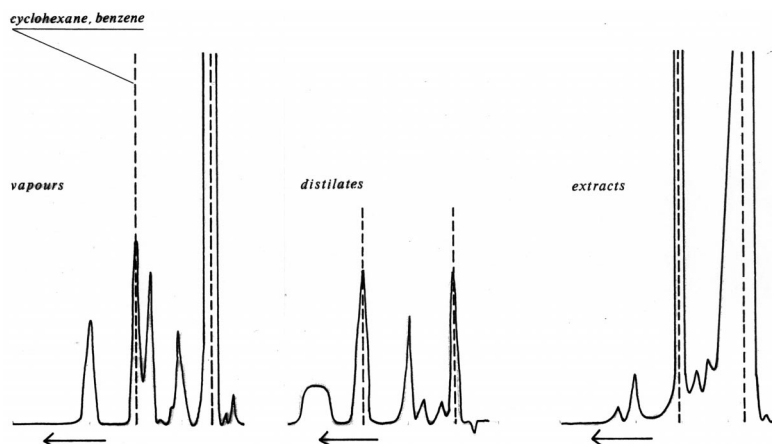


Fig. 13. The chromatograms of the same liver sample after 4 weeks of putrefaction.

In order to study the biological background occurring at the time of the detection or non-volatile organic poisons, the analysis was made on liver subjected to the process of deproteinization by the ammonium sulphate and

tungstate methods [4, 13]. After its deproteinization by the ammonium sulphate method the water phase was subjected to an extraction with ethyl ether in an acid medium (pH 1) and with chloroform in an alkaline (pH 8) one. After the deproteinization by the tungstate method an extraction was carried out with chloroform and ethyl ether from an acid medium (pH 1) and with ethyl acetate and ethyl ether from an alkaline (pH 8) one. The spectrophotometric curves of ether-acid extracts in 0.5 M ammonia solution have their maxima of absorbance at 240 nm, just as barbiturates [5], and the curves of chloroform-alkaline extracts in ethanol have a course characteristic of yohimbine [6] after no more than 7 days of putrefaction of liver (Fig. 14). The substance that had a curve like that of yohimbine was named by us pseudoyohimbine but it is known as a mixture of tryptamine and other amines. The biological background of putrefying liver was also studied by the method of thin-layer chromatography (TLC) [7, 17] and gas chromatography (GC) [9, 10] under various chromatographic conditions. These studies permitted the statement that in spite of differences arising from individual characters of each liver, some recurrent, common features making up its biological background were observed with all the methods applied for isolation and detection.

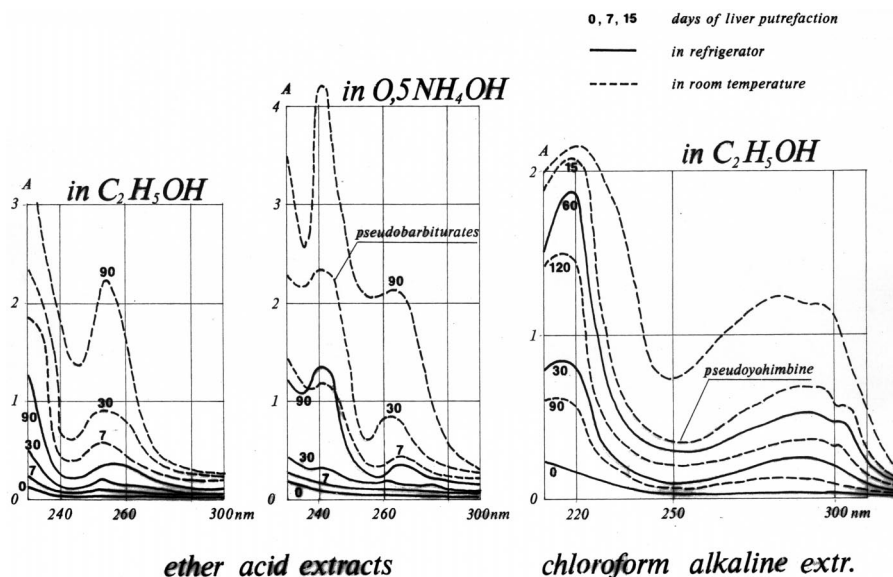


Fig. 14. Spectra of extracts of putrefying liver: (a) – ethereal-acid extracts; (b) – chloroformic-alkaline extracts.

STABILITY OF DRUGS IN *POST-MORTEM* MATERIAL

In order to examine the stability of labile compounds during storage thioridazine and imipramine contained together in extracts from biological material (brain, liver, kidney, stomach and small intestine contents) were quantified. Quantification was carried out immediately after extraction and after a one-month of storage in the refrigerator. In some extracts as much as 45% of imipramine and 34% of thioridazine underwent degradation [12].

Strychnine stability in *post-mortem* material was proved earlier. In the case of death of a 14-year-old boy in 1944, his body was examined in 1948 and an analysis made in 1951. The presence of strychnine was found in the material examined [16]. Morphine and its derivatives were detected in exhumed body after 8 years of death [43], and cocaine (1.24 ng/mg) and its main metabolite, benzoylecgonine (0.37 ng/mg), were found in the Peruvian mummy's hair, living about 1000 years ago [28].

These three examples should be taken as the exceptions but not a rule. *Post-mortem* degradation does not only concern volatile compounds but many other substances, such as benzodiazepines, tricyclic antidepressants and phenothiazines. Many non-volatile compounds, drugs among them, could be metabolised by microorganisms during the putrefactive process. According to Robertson and Drummer [44], the nitrobenzodiazepines clonazepam, nitrazepam, and flunitrazepam are metabolised to their respective 7-amino metabolites in the liver, lungs, myocardium, kidneys, and skeletal muscles by enterobacteria. In contrast recent findings indicate that considerable amounts of "endogenous" benzodiazepines (e.g. desmethyldiazepam, diazepam) may be detected in the patients with hepatic encephalopathy and no benzodiazepines premedication. The origin of "endogenous" benzodiazepines is not clear. It might be possible that the gut flora and/or mammalian cells are able to synthesize the benzodiazepine ring system [29]. Presence of benzodiazepine receptors in human organism may confirm this point of view. Interpretation of positive benzodiazepine findings in forensic toxicology has to take the presence of "endogenous" benzodiazepine into consideration. Those facts underline the necessity of assaying the metabolites of the drugs studied in order to establish the parent drug/metabolite ratio for the interpretation of the results.

CONCLUSION

All the directions of studies presented are connected with the changing *post-mortem* matrix (tissue material undergoing *post-mortem* changes - that is the subject of toxicological analyses). Familiarity with these changes and

processes accompanying them is necessary for the correct interpretation of results obtained in forensic toxicological analyses.

References:

1. Axelrod J., Daly J., Pituitary gland: enzymatic formation of methanol from S-adenosylmethionine, *Science* 1965, vol. 150, pp. 892–893.
2. Ballantyne B., Bright J. E., Williams P., The *post-mortem* rate of transformation of cyanide, *Forensic Science International* 1974, vol. 3, pp. 71–76.
3. Bogusz M., Guminska M., Markiewicz J., Studies on the formation of endogenous ethanol in blood putrefying in vitro, *Journal of Forensic Medicine* 1970, vol. 17, pp. 156–159.
4. Borkowski T., Obrazy chromatograficzne i spektrofotometryczne wątroby ludzkiej w toku procesu gnilnego [nieopublikowana praca doktorska, Akademia Medyczna, Kraków 1963].
5. Borkowski T., Badania wyciągów wątroby pobranej ze zwłok w toku jej rozkładu gnilnego. Część I. Badania spektrofotometryczne wyciągów eterowokwaśnych z wątroby w toku jej rozkładu gnilnego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1968, t. 18, s. 101–108.
6. Borkowski T., Badania wyciągów wątroby pobranej ze zwłok w toku jej rozkładu gnilnego. Część II. Badania chromatograficzne wyciągów eterowokwaśnych z wątroby w toku jej rozkładu gnilnego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1968, t. 18, s. 229–236.
7. Borkowski T., Badania wyciągów wątroby pobranej ze zwłok w toku jej rozkładu gnilnego. Część III. Badania spektrofotometryczne wyciągów chloroformowo-alkalicznych z wątroby w toku jej rozkładu gnilnego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1969, t. 19, s. 72–76.
8. Borkowski T., Bogusz M., Zmiany aktywności acetylocholinesterazy we krwi i w mózgu w toku rozkładu gnilnego, *Folia Medicinæ Cracoviensia* 1967, t. IX, s. 409–428.
9. Borkowski T., Chłobowska Z., Dłużniewska A. [i in.], Badania za pomocą chromatografii gazowej tła biologicznego wyciągów wątroby w toku jej rozkładu gnilnego. Część I, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1977, t. 27, s. 25–34.
10. Borkowski T., Chłobowska Z., Dłużniewska A. [i in.], Badania za pomocą chromatografii gazowej tła biologicznego wyciągów wątroby w toku jej rozkładu gnilnego. Część II, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1977, t. 27, s. 219–230.
11. Chłobowska Z., Zachowanie się octanów alkoholi wyższych w materiale biologicznym, *Z zagadnień kryminalistyki* 1972, z. VII, s. 55–60.
12. Chłobowska Z., Kała M., Z badań nad przemianami niektórych leków psychotropowych w materiale biologicznym, *Z zagadnień kryminalistyki* 1977, z. XII, s. 76–85.

13. Chrobok F., Spektrofotometryczne tło wątroby w zależności od metod wyosabniania, *Z zagadnień kryminalistyki* 1977, z. XII, s. 27–33.
14. Clarke's isolation and identification of drugs, Moffat A. C. [ed.], The Pharmaceutical Press, London 1986.
15. Curry A. S., Price D. E., Rutter E. R., The production of cyanide in *post mortem* material, *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1967, vol. 25, pp. 339–344.
16. Dłużniewska A., Zatrucia strychniną, *Z zagadnień kryminalistyki* 1972, t. VII, s. 113–123.
17. Dłużniewska A., Tło biologiczne wątroby w analizie toksykologicznej na obecność trucizn organicznych przy zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1977, t. 27, s. 115–118.
18. Fechner G., Gee D., Study on the effects of heat on blood and the *post-mortem* estimation of carboxyhaemoglobin and methaemoglobin, *Forensic Science International* 1989, vol. 40, pp. 63–67.
19. Gilg T., Wittmann S., Peschl V. O. [et al.], Serummethanolspiegel nach aufnahme verschiedener obstsorten mit und ohne Aethanolbelastung, *Zentralblatt Rechtsmedizin* 1990, Bd. 34, S. 151–152.
20. Gilg T., von Mayer L., Liebhardt E. [et al.], Methanolbildung in der perfundierten rattenleber beim fremdstoffabbau unter aethanolbeastung, *Blutalkohol* 1987, Bd. 24, S. 316–320.
21. Gilg T., von Mayer L., Genese und bedeutung endogener humaner methanolspiegel fuer die begleitstoffbeurteilung, *Zentralblatt Rechtsmedizin* 1992, Bd. 38, S. 37–38.
22. Grüner O., Bilzer N., Liebmann J., Zur methanolbildung in vitro und in vivo (Methanolbildung nach pektingaben), *Blutalkohol* 1994, Bd. 31, S. 228–232.
23. Gubała W., Marynowska-Jaglarz M., N-butanol in blood of the bodies remaining in water, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1986, t. 36, s. 144–151.
24. Haffner H. T., Graw M., Besserer K. [et al.], Endogenous methanol: variability in concentration and rate of production. Evidence of a deep compartment?, *Forensic Science International* 1996, vol. 79, pp. 145–154.
25. Harpula Z., Janowska E., Łabędź J., Zmiany aktywności cholines-terazy w wątrobie w toku jej rozkładu gnilnego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1977, t. 27, s. 231–235.
26. Hewitt L. F., Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry, Edinburg 1950.
27. Jones A. W., Andersson R., Sakshaug J. [et al.], Possible formation of ethanol in *postmortem* blood specimen after *antemortem* treatment with mannitol, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 157–158.
28. Kintz P., Tracqui A. Q., Mangin P., Identification of cocaine and bezoylecgonine in a mummy hair, Abstract book of the 31st TIAFT Meeting in Leipzig, August 16–20, Leipzig 1993.

29. Köppel C., Tenczer J., Detection of "endogenous" benzodiazepines in the patients with hepatic encephalopathy by mass-spectarl techniques. Forensic toxicology, Proceedings of the 29th Meeting of TIAFT, Kaempe B. [ed.], Copenhagen 1991.
30. Lokan R. J., James R. A., Apparent *post-mortem* production of high levels of cyanide in blood, *Forensic Science Society* 1987, vol. 27, pp. 253–259.
31. Markiewicz J., Reakcje chemiczne rozkładu hemoglobiny [praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 1962].
32. Markiewicz J., Redoxpotential und wasserstoffexponent des *in vitro* verfaulenden leichenblutes, Kongress und Tagungsberichte der Martin Luther Universität, Halle 1979.
33. Markiewicz J., Zwiększone zawartości COHb pochodzenia endogennego we krwi sekcyjnej, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1980, t. 30, s. 1–4.
34. Melvin J. R., Cronholm L. S., Simson L. R. [et al.], Bacterial transmigration as an indicator of time of death, *Journal of Forensic Sciences* 1984, vol. 29, pp. 412–417.
35. Moriya F., Hashimoto Y., Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals, *Journal of Forensic Sciences* 1999, vol. 41, pp. 1131–1135.
36. Nedoma J., O powstawaniu cyjanków i rodanków w gnijącej krwi, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1968, t. 18, s. 109–114.
37. Nedoma J., Chłobowska Z., Madej A. [i in.], Tło materiału biologicznego przy wykrywaniu trucizn lotnych metodą chromatografii gazowej, *Z zagadnień kryminalistyki* 1975, z. X, s. 69–90.
38. Niwayama G., *Postmortem* blood microbiology using sterile autopsy technique, *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1971, vol. 105, pp. 247–256.
39. O'Neal C. L., Poklis A., *Postmortem* production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 1996, vol. 17, pp. 8–20.
40. Oritani S., Maeda H., Application of CO-oximeter system to analysis of carboxy-hemoglobin in thermocoagulated blood, Abstract book of the 34th TIAFT Meeting, August 11–15, Interlaken 1996.
41. O'Toole W. F., Saxena H. M., Golden A. [et al.], Studies of *post-mortem* microbiology using sterile autopsy technique, *Archives of Pathology* 1965, vol. 80, pp. 540–547.
42. Péliissier-Alicot A-L., Gaulier J-M., Champsaur P. [et al.], Mechanisms underlying *postmortem* redistribution of drugs: a review, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, vol. 27, pp. 533–543.
43. Preuß R. [ed.], Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxicologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1969.
44. Robertson M. D., Drummer O. H., *Postmortem* drug metabolism by bacteria, *Journal of Forensic Science* 1995, vol. 40, pp. 382–386.

45. Senkowski C. M., Senkowski B. S., Thompson K. A., The accuracy of blood alcohol analysis using headspace gas chromatography when performed on clotted samples, *Journal of Forensic Sciences* 1990, vol. 35, pp. 176–182.
46. Stöhlmacher P., Methanol aus ethanol? Die spaltung der C-C-bindung durch mikroorganismen, *Zentralblatt Rechtsmedizin* 1994, Bd. 42, S. 492.
47. Yamazaki M., Wakasugi C., *Postmortem* changes in drug-metabolizing enzymes of rat liver microsome, *Forensic Science International* 1994, vol. 67, pp. 155–168.
48. Zschocke D., Potential disturbance due to autolysis and putrefaction (Introduction to thanatochemistry), [in:] Müller R. K. [ed.], *Toxicological analysis*, Verlag Gesundheit, Berlin 1991.

WPLYW ZMIAN POŚMIERTNYCH ZACHODZĄCYCH W MATERIALE BIOLOGICZNYM NA INTERPRETACJĘ WYNIKÓW ANALIZY TOKSYKOLOGICZNEJ

Maria KAŁA, Ewa CHUDZIKIEWICZ

WPROWADZENIE

Procesy biochemiczne, które są ściśle kontrolowane w żywym organizmie, mogą ulec drastycznej zmianie w czasie choroby. Przebieg agonii może wpłynąć na stężenia wielu substancji (np. stwierdzano obniżenie stężenia glukozy), które występowały w żywym organizmie na poziomie fizjologicznym. Zatrzymanie akcji serca, oddechu i pracy mózgu stanowi definicję śmierci. Po tym fakcie wszystkie zmiany zachodzące w zwłokach określane są jako procesy tanatochemiczne.

W ciągu kilku godzin po zgonie krew w układzie naczyniowym krzepnie i jednocześnie następuje rozkład morfotycznych elementów krwi. Efektywność rozkładu komórek krwi wpływa na to, czy krew sekcyjna jest skrzepła lub całkowicie płynna lub częściowo skrzepła i częściowo płynna. Fibrynowe skrzepy niezmiennie składają się z dużej liczby czerwonych krwinek, dlatego skrzep jest bogaty w czerwone ciała krwi, a ubogi w surowicę. Czasami serce i duże naczynia krwionośne mogą zawierać dużo dwuwarstwowego skrzepu – warstwa dolna jest typowym czerwonym skrzepem, a warstwa górna składa się z bladeżółtawego, gąbczastego skrzepu w dużej mierze wolnego od czerwonych krwinek. W konsekwencji próbki krwi pobrane w czasie sekcji charakteryzują się zróżnicowanymi zawartościami czerwonych krwinek i białek, a to ma wpływ na oznaczenie łatwo rozpuszczalnych we wodzie substancji, np. na stężenie etanolu. Krew pobrana z naczyń w kończynach jest najczęściej płynna i w dużej mierze pozbawiona skrzepu, czyli jest najbardziej homogeniczną próbką do analizy. Obecność skrzepów we krwi nie wpływa na dokładność oznaczeń alkoholu we krwi, jeżeli oznaczenia te przeprowadzamy metodą chromatografii gazowej przez analizę fazy nadpowierzchniowej [45].

We wczesnej fazie pośmiertnego rozkładu zwłoki ulegają autolizie, tj. następuje rozkład narządów pod wpływem endogennych enzymów. Równocześnie zaczyna się rozkład, głównie na skutek procesów redukcyjnych spowodowanych działaniem endogennych i egzogennych bakterii i ich enzymów (np. *Staphylococcus* są zdolne do wytwarzania bardzo aktywnych proteaz) i gnicie, którego podstawą są reakcje utleniania. Tkanki zwłok ludzkich pozostają wolne od egzogennych infekcji bakteryjnych do około 20 godzin po zgonie [38, 41]. Jednak przemieszczanie się wewnątrzustrojowych mikroorganizmów (niektórych bakterii i organizmów grzybowych) przez ściany jelita cienkiego zachodzi w ciągu 2 do 3 godzin w temperaturze 37°C, 5 do 6 godzin w temperaturze 25°C i 72 godzin w temperaturze 4°C [34].

Przekształcanie i rozkład naturalnych struktur ciała (np. enzymatyczne trawienie części składowych komórek i błon komórkowych) z równoczesnym nagromadzeniem się bakteryjnych metabolitów może doprowadzić do powstania olbrzymiej ilości nowych związków chemicznych. Z drugiej strony te czynniki i warunki mogą

także powodować rozkład wielu egzogennych, toksykologicznie istotnych związków, które zostały wprowadzone do organizmu przed zgonem. Ponadto autoliza komórek i procesy rozkładowe biorą udział w pośmiertnej redystrybucji leków, co oznacza zależność stężenia leku od miejsca i czasu pobrania materiału. Redystrybucja może wystąpić natychmiast po zgonie na skutek biernego uwalniania się leku z jego rezerwuaru (przewodu pokarmowego, wątroby lub płuc) [42].

Kierunek i intensywność postępujących przemian pośmiertnych zachodzących w czasie zależy od wielu czynników, wśród których istotną rolę odgrywają warunki fizyczne zmarłej osoby (tusza, wiek), choroba poprzedzająca zgon, urazy, mechanizm zgonu oraz efekt działania trucizn lub leków. Duże znaczenie odgrywa wpływ czynników środowiskowych, na które zwłoki są ekspozowane. Co więcej, przemiany degradacyjne mogą zachodzić odmiennie w różnych narządach tych samych zwłok. Jest to uwarunkowane zróżnicowaną zawartością w narządach własnych układów enzymatycznych oraz umiejscowieniem narządu. Procesy aerobowe zachodzące na powierzchni narządów są szybsze niż anaerobowe, zachodzące w ich wewnętrznych partiach. W próbach krwi i wycinkach narządów wewnętrznych przechowywanych w naczyniach zachodzą podobne procesy rozkładowe [48].

Przyjmuje się powszechnie, że zamrażanie materiału biologicznego jest najlepszą metodą zapobiegającą rozkładowi zawartych w nim leków. Jest to słuszne dla wielu związków, ale istnieje wiele znaczących wyjątków, jak fenotiazyny. Na przykład, jeżeli osocze krwi z dodatkiem chloropromazyny zamrożono, przechowywano w temperaturze -20°C i rozmrożono, to związek pozostawał niezmienny. Jeśli jednak tym samym procesom poddano próbki krwi pobrane w przypadku przyjęcia chloropromazyny, to wówczas rzeczywiste stężenie leku macierzystego podwoiło się w czasie cyklu zamrażania i rozmrażania z powodu wtórnej redukcji sulfotlenków i N-tlenkowych metabolitów do związku macierzystego. Podobnie, oznaczenie leku po 18-dniowym przechowywaniu w temperaturze 4°C również wykazało wzrost stężenia niezminionej chloropromazyny w osoczu [18].

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad zmianami pośmiertnymi zachodzącymi w materiale biologicznym, które prowadzono w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie na przestrzeni kilkudziesięciu lat. Wyniki te odniesiono do badań przeprowadzonych i opublikowanych przez innych autorów.

ZMIANY WYKŁADNIKA WODOROWEGO I POTENCJAŁU REDOKS

Od około 40 lat prowadzi się w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie badania nad pośmiertnymi zmianami zachodzącymi w materiale biologicznym. Inicjatorem tych badań był profesor Jan Markiewicz, wieloletni dyrektor Instytutu.

Autor ten badał czynniki warunkujące oraz sterujące przebiegiem reakcji biochemicznych w materiale biologicznym, a mianowicie wykładnik wodorowy oraz potencjał oksydacyjno-redukcyjny próby krwi pobranej i zabezpieczonej w naczyniu [32]. Autor stwierdził, że wykładnik wodorowy próby krwi przechowywanej *in vitro* zmieniła się podobnie jak wykładnik wodorowy w tkankach rozkładających się zwłok. Zmiany te były szczególnie szybkie w części przypowierzchniowej, do której łatwo dyfundował tlen atmosferyczny. W ciągu kilku dni następowało szybkie zakwaszenie krwi do wartości nawet poniżej 5, a po tym czasie – wykładnik wodorowy stopniowo wzrastał (rycina 1). W próbach krwi przechowywanych w warunkach ze zmniejszo-

nym dopływem tlenu, np. przez nawarstwienie krwi parafiną względnie przy pomiarach prowadzonych na dnie naczyń, zmiany pH były powolniejsze i na ogół wykładnik wodorowy pozostawał w kwaśnym zakresie (rycina 2).

Mechanizmy odpowiedzialne za obniżanie pH krwi są złożone. Pierwszym etapem jest hipoksja występująca w agonii. Na skutek niedotlenienia glikogen jest gwałtownie wyczerpywany i wspomniany proces anaerobowy prowadzi do kumulacji kwasu mlekowego i nieorganicznych fosforanów. Później, w wyniku procesów rozkładowych, powstaje wiele kwasów i zasad (np. amoniak z rozkładu aminokwasów), co prowadzi do podwyższenia pH materiału biologicznego.

Z badań prowadzonych przez profesora Markiewicza [32] wynikało dalej, że potencjał redoks wykazywał również charakterystyczne zmiany, zależne – podobnie jak pH – od dopływu tlenu. Po bardzo gwałtownym opadzie początkowym następował wzrost z mniej lub bardziej wykształconym maksimum i dalszym, raczej powolnym, spadkiem. Maksimum było wyraźne przy dostępie tlenu do krwi (rycina 3). Przy ograniczonym dopływie tlenu maksimum to było znacznie mniejsze, a czasem nawet w ogóle się nie pojawiało (rycina 4). Występowanie wspomnianego maksimum dowodzi – wg Hewitta [26] – wytwarzania się w materiale biologicznym nadtlenu. Ich obecność może między innymi tłumaczyć zanikanie we krwi i narządach pobranych ze zwłok szeregu trucizn organicznych. W próbach krwi zaprawionych środkiem antyseptycznym – merthiolatem – zarówno zmiany pH, jak i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, były ledwo zaznaczone.

POWSTAWANIE ALKOHOLU ETYLOWEGO ENDOGENNEGO

Następna grupa badań prowadzonych w Instytucie dotyczyła warunków i przebiegu wytwarzania się substancji toksycznych w toku procesów gnilno-rozkładowych. W tej grupie weryfikowano hipotezę, że źródłem alkoholu endogennego w gnijącej *in vitro* krwi może być glukoza [3]. Ze względu na glikolizę i procesy dyfuzyjne w sekcyjnej próbce krwi obserwuje się silnie zróżnicowane, zwykle znacznie przekraczające fizjologiczne poziomy glukozy. W toku rozkładu krwi przebiegającego *in vitro* zaobserwowano szybki zanik glukozy, najdalej do trzech dni. Począwszy od trzeciego dnia zaczynał pojawiać się alkohol, przy czym jego poziom osiągnął największą wartość w 9–12 dniu. Jeżeli początkowo stężenie glukozy nie przekraczało górnej granicy stężeń fizjologicznych, to wytworzona ilość alkoholu odpowiadała prawie stechiometrycznie ilości zawartej we krwi glukozy. Przy wyższych stężeniach glukozy takiej zależności nie stwierdzono. Jeżeli w toku jej gnicia dodano do krwi glukozę, to zawartość alkoholu endogennego wyraźnie wzrastała, osiągając stężenia nawet powyżej 2‰ (rycina 5).

Obecnie wiemy, że problem powstawania alkoholu etylowego po zgonie nie jest takie proste. Może on bowiem powstawać we krwi rozkładającej się w zwłokach lub we krwi rozkładającej się *in vitro*. Przeciwnicy twierdzenia, że glukoza jest przekształcana do alkoholu po zgonie, argumentują, że zawartość glukozy w niekonserwowanej próbce krwi znika w ciągu kilku godzin, podczas gdy wytworzenie się alkoholu po zgonie wymaga minimum kilku dni i obecności niektórych bakterii [14]. Według O'Neala i Polkisa [39] bakterie *Escherichia coli* i *Candida albicans* są główną przyczyną syntezy pośmiertnej etanolu, ale istnieje 58 gatunków bakterii i 17 gatunków drożdży, które również mogą produkować etanol. Miejscami najaktywniejszej synte-

zy etanolu są tkanki z wysoką zawartością glukozy, ponieważ glukoza jest głównym substratem do wytwarzania alkoholu endogennego. Wytwarzaniu alkoholu etylowego z udziałem bakterii towarzyszy powstawanie innych lotnych związków, takich jak alkohol metylowy, formaldehyd, alkohol n-propylowy, kwas propionowy, aceton, kwas octowy, aldehyd octowy, kwas n-masłowy i izo-masłowy. Twierdzi się, że spośród tych związków dwa ostatnie (kwasy n-masłowy i izo-masłowy) najczęściej towarzyszą etanolowi wytwarzanemu przez bakterie rozkładowe.

W celu ustalenia, czy mamy do czynienia z pośmiertnie wytworzonym lub *in vivo* przyjętym etanolem, istotne znaczenie posiadają okoliczności zdarzenia i potwierdzająca analiza ciała szklistego gałki ocznej oraz moczu. Ciało szkliste jest pomocne, ponieważ jest lepiej zabezpieczone przed infiltracją etanolu wytworzonego przez bakterie gnilne. Mocz jest przydatny, ponieważ zazwyczaj nie zawiera lub zawiera mało substratu (glukozy) do jego bakteryjnego przetworzenia do etanolu. Dlatego też stężenie etanolu w pojedynczej próbce krwi sekcyjnej jest zazwyczaj nie do zinterpretowania bez równoległego badania stężenia etanolu w ciałku szklistym oka, moczu, jak również informacji zebranych na miejscu zgonu i z okoliczności zdarzenia.

NIEKTÓRE INNE LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE

Metanol, który często towarzyszy etanolowi, jest trucizną działającą poprzez swoje metabolity i może również być również wykrywany w zwłokach. Należy dodać, że metanol występuje również w żywym organizmie, ponieważ jest substancją endogenną.

Pochodzenie metanolu endogennego jest niejasne. Przyjmuje się, że metanol może wytwarzać się z adenozylometioniny, tj. aktywnego biologicznie metylu, w przysadce mózgowej [1] lub z demetylacji etanolu w jelitach przez florę bakteryjną [46]. Jednakże opublikowano również wyniki badań wskazujące, że metanol jest produktem metabolizmu zachodzącego w wątrobie [20]. Metanolu, który powstaje w organizmie z pektyn w wyniku hydrolizy zawartych w nich metyloestrowych połączeń nie można uznać za prawdziwie endogenne, a ten może przewyższać stężenie metanolu endogennego wielokrotnie [19, 21, 22]. Stężenia metanolu endogennego są bardzo niskie i mieszczą się w granicach od 0,1–0,2 mg/kg (0,1 mg/kg jest granicą oznaczalności metody użytej do analizy ilościowej) do 3,4 mg/kg [24]. Te wartości są zazwyczaj kilka rzędów wielkości mniejsze od stężeń metanolu występujących przy zatruciach. Podanie mannitolu krótko przed zgonem może ułatwiać wytwarzanie się pośmiertnego metanolu, n-propanolu, izopropanolu i n-butanolu [27].

W badaniach prowadzonych w Instytucie Ekspertyz Sądowych zainteresowano się również n-butanolem jako jednym z produktów procesów gnilno-fermentacyjnych krwi, pojawiającym się relatywnie często we krwi pobranej ze zwłok wydobywanych z wody [23]. Stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem n-butanolu w próbkach krwi pobranych ze zwłok wydobytych z wody a czasem przebywania tych zwłok w wodzie. Korelacja ta może stanowić podstawę empirycznej metody określania czasu zgonu w przypadkach utonięć (rycina 6).

POCHODNE HEMOGLOBINY

Analiza mająca na celu stwierdzenie obecności obcych pochodnych hemoglobiny jest bardzo istotnym czynnikiem podczas medyczno-sądowego dochodzenia przyczyny zgonu nie tylko wśród ofiar pożarów. Tlenkowęgłowa pochodna hemoglobiny (karboksyhemoglobina, HbCO) występująca w niewielkich ilościach jest naturalnym składnikiem ludzkiego organizmu, stanowi bowiem produkt rozkładu hemoglobiny. Na początku tego procesu grupa hemowa w hemoglobinie jest hydroksylowana przez tlenoksygenazę hemową przy metinowym atomie węgla C-5, a następnie, dzięki niezupełnie wyjaśnionemu mechanizmowi, ten atom zostaje odszczepiony jako tlenek węgla, który może być oznaczony jako HbCO. Z hemoglobiny powstaje choleglobina (barwnik żółciowy) i HbCO.

Choleglobina – obok sulfhemoglobiny – jest obecna w gnilnie rozłożonych zwłokach. Podczas przechowywania rozłożonej krwi zmniejszająca się aktywność katalazy sprzyja wytwarzaniu się choleglobiny. W czasie tworzenia się choleglobiny zawartość łatwo odszczepialnego żelaza wzrasta i to proporcjonalnie do ilości wytworzonej choleglobiny. Przemiana hemoglobiny w choleglobinę pociąga za sobą wytwarzanie się w przechowywanej próbce krwi tlenku węgla. Jego istnienie powoduje, że w ciągu 24–48 godzin w sekcyjnej próbce krwi pojawia się gnilnie zmieniona tlenkowęgłowa pochodna hemoglobiny.

Profesor Markiewicz wykazał, że w normalnych warunkach gnicia krwi *in vitro* pojawiały się ilości COHb dochodzące do 5–7%. Z reguły maksymalna ilość COHb w gnijącej krwi utrzymywała się przez kilka dni, a następnie zanikała. Pojawianie się HbCO w gnijącej krwi nie zależało od temperatury, w jakiej była przechowywana, w granicach temperatur od 2°C do 37°C. Zasadnicze różnice ilościowe w zakresie występowania endogennego HbCO zachodziły w przypadkach uprzedniego ogrzania krwi sekcyjnej do temperatury 65°C przez co najmniej 3 min [6]. W takich przypadkach poziom HbCO pochodzenia endogennego w ciągu kilkunastu dni mógł przekroczyć nawet poziom 30% (rycina 7). Wszystkie oznaczenia HbCO były prowadzone z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej przy dwóch długościach fal.

Według Fechnera i in. [18] stężenie HbCO nie ulega zmianie przy krótkim ogrzaniu krwi nawet do temperatury 75°C, co ma istotne znaczenie przy interpretacji wyników oznaczania HbCO we krwi pobranej ze zwłok osób zmarłych w pożarach. Autorzy ci wykazali, że nie następowało wytwarzanie się HbCO w czasie przechowywania krwi sekcyjnej, a oznaczona przez nich zawartość HbCO, wynosząca 1–2%, mogła być spowodowana błędem metod. Dalej autorzy ci dowodzili, że bezkrytyczne stosowanie metod spektrofotometrycznych nawet przy dwóch długościach fali mogło spowodować wzrost poziomu symulacyjnego HbCO do rzędu 20%. Pomiar stężenia HbCO przy jednej długości fali w obecności innych pochodnych hemoglobiny może dać widmo tła, które prowadzi do rzekomych pozytywnych wyników. Jedno- lub dwufalowe metody spektrofotometryczne mogą być stosowane jedynie wtedy, kiedy we krwi występują dwie pochodne hemoglobiny – oksyhemoglobina (HbO) i HbCO. Powyższa obserwacja jest zgodna z wynikami badań uzyskanymi przez Oritaniego i Maeda [40], którzy porównywali zawartości HbCO w skoagulowanej termicznie krwi, oznaczone z zastosowaniem aparatu CO-oksometr (CO-oximeter) i metodą chromatografii gazowej (GC). Próbkę krwi z doświadczalnie przygotowanymi różnymi zawartościami HbCO poddawano ogrzewaniu do 75°C i 80°C. Pomiar HbCO,

przeprowadzone przy użyciu CO-oksymetru, wykazywały fałszywie wysokie wartości, podczas gdy zawartość całkowitej hemoglobiny była zredukowana w porównaniu do oznaczeń tych związków w próbkach krwi nie poddawanych termicznej obróbce. Powyższe dowodzi, że podwyższenie wartości wyników oznaczeń HbCO zależało od obniżenia poziomu całkowitej hemoglobiny z powodu termokoagulacji innych pochodnych hemoglobiny. Dlatego też zmierzone zawartości HbCO w termicznie skoagulowanych próbkach krwi skorygowano w stosunku do obniżenia się całkowitej rozpuszczalnej hemoglobiny. Tak obliczone zawartości HbCO były nieznacznie niższe niż wartości przed ogrzewaniem, ale zgodne z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem metody GC. Oznaczone wartości HbCO metodą GC były również nieco wyższe w próbach krwi poddawanych ogrzewaniu.

Próbki krwi sekcyjnej wykazywały również bardzo zmienne poziomy methemoglobiny (MetHb) w czasie ich przechowywania. Kiedy próbki krwi poddawano ogrzewaniu, ich naturalna czerwona barwa stawała się bardziej brunatna, a konsystencja gęstsza. Te zmiany nasilały się w ciągu pierwszych 3–4 dni, po czym barwa przybierała czerwieniszy odcień. W tych badaniach obserwowano początkowo wzrost poziomu MetHb zaraz po ogrzewaniu, po czym następował jego powolny spadek [18].

CYJANKI ENDOGENNE

Istotne znaczenie dla interpretacji wyników analizy na zawartość cyjanów ma możliwość wytwarzania się jonów cyjanowych we krwi sekcyjnej. Nedoma [36] wykazała, że w czasie rozkładu gnilnego zachodzącego w temperaturze pokojowej przy dostępie powietrza mogą się wytworzyć we krwi jony cyjanowe w ilościach (do 80 mg/l) spotykanych w przypadkach ostrych, śmiertelnych zatruc cyjanami (rycina 8). Tworzenie się jonów cyjanowych nie zachodziło w próbach krwi, których rozkład gnilny przebiegał bez dostępu powietrza. Zarówno cyjanki wprowadzone do krwi z zewnątrz, jak i cyjanki wytworzone w procesie rozkładu gnilnego, przechodziły w rodanki niezależnie od tego, czy krew ulegała gniciu przy dostępie czy też bez dostępu powietrza. Poziom powstałych w ten sposób rodanków nie malał w ciągu trzech miesięcy (rycina 9).

W dwóch opisanych przypadkach sekcji, w których wykazano obecność cyjanów najwyraźniej pośmiertnego pochodzenia, ich maksymalne stężenie wynosiło 1–2 mg/l. W jednej próbce krwi sekcyjnej stwierdzono, że stężenie cyjanów musiało wzrosnąć z 3 mg/l do 40 mg/l po 12 tygodniach przechowywania, zaś w drugiej próbce, pobranej z tych samych zwłok, a przechowywanej z dodatkiem fluorku sodu, cyjanki się nie wytworzyły [15]. W dalszych badaniach ci sami autorzy wykazali w próbach krwi przeznaczonych do transfuzji, ale po upływie terminu ich ważności, który wynosi 2 miesiące przechowywania w temperaturze pokojowej, bardzo wysokie stężenia cyjanów rzędu 100 mg/l. Lokan i in. [30] wykryli wysokie stężenia cyjanów we krwi sekcyjnej pobranej w trzech przypadkach nagłych zgonów, w których okoliczności skłaniały do wykluczenia zatrucia cyjanami i w których nie można było udowodnić źródła pochodzenia cyjanów. Te trzy przypadki wyłoniono, przeprowadzając rutynowe badania skryningowe prób krwi pochodzących z 331 sekcji.

Przytoczone dane sugerują, że wytwarzanie się cyjanów we krwi sekcyjnej występuje rzadko. Do dnia dzisiejszego nie znaleziono konkretnego wyjaśnienia powodu wytwarzania się wysokich stężeń jonów cyjanowych w niektórych próbach krwi

sekcyjnej. Endogenne tiocyjanki obecne we krwi mogą być przekształcane *in vitro* w cyjanki. Proces ten jest katalizowany przez hemoglobinę i zachodzi w słabo kwaśnym środowisku. Cyjanki mogą być również artefaktami tworzącymi się w wyniku przedanalizycznego zakwaszenia krwi, zawierającej tiocyjanki. W każdym przypadku jest mało prawdopodobne, aby źródłem endogennych cyjanków były tiocyjanki, których normalne stężenie we krwi rzadko przekracza 12 mg/l, nawet u palaczy. Dlatego też interesujące wydają się spekulacje na temat udziału w tworzeniu się endogennych cyjanków mikroorganizmów, których rozmaite gatunki dokonują inwazji na układ naczyniowy po zgonie – zarówno z zewnętrznych, jak i wewnętrznych źródeł. Tworzenie się cyjanków w formie cyjanoglikozydów jest dobrze udokumentowane w niektórych roślinach. Mikrobowa cyjanogeneza jest również opisywana, lecz częściej przeważają twierdzenia o udziale w niej grzybów, a nie bakterii. Eksperymentalnie wykazano, że istotną zdolność produkcji cyjanków mają bakterie *Pseudomonas*, ale tylko na specjalnych pożywkach i w ściśle określonych warunkach wzrostu. Wydajność tworzenia cyjanków była maksymalna na początku stacjonarnej fazy wzrostu, czyli po około 12–24 godzin po posianiu bakterii na podłoże, a dalsza inkubacja nie dostarczała cyjanków [30]. Ballantyne [2] opisał znaczne obniżanie się stężenia cyjanku w czasie przechowywania krwi i wycinków (płuc, wątroby i nerek) królików uśmierconych za pomocą cyjanku potasu. Spadek ten tłumaczył przemianami cyjanków w tiocyjanki, ale nie wykazał udziału w nim bakterii.

SKUTKI AKTYWNOŚCI ENZYMÓW W MATERIALE SEKCYJNYM

Badania nad zanikaniem endogennych substancji istotnych dla badań toksykologicznych dotyczyły oznaczania aktywności acetylocholinesterazy we krwi, mózgu i wątrobie, a także jej związku ze stężeniem hemoglobiny. Stwierdzono, że aktywność tego enzymu oznaczona we krwi pobranej od osób żywych lub ze zwłok nie ulegała zmianom przez co najmniej 60 dni podczas przechowywania próbek w lodówce (rycina 10). Podobne wyniki otrzymano dla wycinków mózgu, pod warunkiem pobrania do badań prób z homogenatu całego mózgu lub co najmniej jednej całej jego półkuli. Aktywność enzymu ulegała postępującemu obniżeniu podczas przechowywania w temperaturze pokojowej, przy czym spadek ten miał mniej lub bardziej charakterystyczny przebieg w zależności od rodzaju badanego materiału [8, 25]. We krwi pobranej od osób żywych aktywność enzymu przez pierwsze 8 dni nie ulegała zmianie, a następnie malała. We krwi pobranej ze zwłok aktywność acetylocholinesterazy wykazywała brak istotnych zmian przez okres 4 pierwszych dni przechowywania. W mózgu aktywność acetylocholinesterazy ulegała postępującemu, stosunkowo równomiernemu obniżeniu. Natomiast aktywność esterazy cholinowej w wątrobie w czasie samoistnego procesu gnilnego była bardzo zmienna i trudna do zinterpretowania, przy czym ani homogenizacja, ani temperatura nie wpływały na przebieg zmian aktywności tego enzymu w wątrobie [25].

Stwierdzono natomiast ścisłą zależność między aktywnością acetylocholinesterazy erytrocytów a stężeniem hemoglobiny, ale tylko przez pierwszych kilka dni od zgonu i od momentu pobrania krwi. Jest to szczególnie ważne, bo hemoglobina we krwi ze zwłok wykazuje znacznie większe różnicowanie ilościowe niż we krwi osób żywych [8, 25].

W badaniach przeprowadzonych przez Chłobowską [11] nad zanikaniem egzogennych substancji zwrócono uwagę na zanikanie estrów alkoholi wyższych w materiale biologicznym. Szybkość zaniku octanów była największa w wycinkach wątroby, a znacznie mniejsza w wycinkach płuc i mózgu. Zanikanie to było spowodowane głównie działaniem enzymów – esteraz, ponieważ po ich inaktywacji związkiem fosforoorganicznym nastąpiło całkowite zahamowanie zaniku. Szybkość rozkładu octanów wzrastała w miarę zwiększania się długości łańcucha alkoholowego (rycina 11).

Możliwość występowania po śmierci szczątkowej aktywności enzymów potwierdzono w badaniach pośmiertnych zmian dichlorfosu pod wpływem wątrobowych i osoczowych esteraz [35]. Inni autorzy [47] badali pośmiertne zmiany enzymów metabolizujących leki we frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów. Wyniki tych badań pozwoliły na stwierdzenie, że aktywność enzymów wątrobowych nie ustawała natychmiast po zgonie, ale ulegała stopniowemu zahamowaniu w ciągu pierwszych 48 godzin. Występowanie szczątkowej aktywności enzymatycznej, zależnie od rodzaju enzymu, jest zatem prawdopodobne w pierwszych godzinach po zgonie. Te wyniki uwydatniają konieczność oznaczania metabolitów leków w celu ustalenia leku macierzystego.

METODY ANALITYCZNE I MATRYCE BIOLOGICZNE

Szczegółowo analizowano tło biologiczne materiału sekcyjnego przy wykrywaniu lotnych i trudno lotnych trucizn organicznych. Badania przeprowadzono w zależności od zastosowanej metody wyosabniania i detekcji. Dla opracowania tła biologicznego występującego przy oznaczaniu trucizn lotnych określono obrazy lotnych produktów rozkładających się prób wątroby, mózgu i płuc (rycina 12), stosując destylację, ekstrakcję i analizę fazy nadpowierzchniowej do wyosabniania (rycina 13) i chromatografię gazową z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) do detekcji [37].

W celu opracowania tła biologicznego występującego przy wykrywaniu trudno lotnych trucizn organicznych przedmiotem badań była wątroba poddawana procesowi odbiałczania metodą siarczanowo-amonową i wolframianową [4, 13]. Po odbiałczeniu wycinków wątroby metodą siarczanowo-amonową fazę wodną poddawano ekstrakcji eterem etylowym ze środowiska kwaśnego ($\text{pH} = 1$) i chloroformem ze środowiska alkalicznego ($\text{pH} = 8$). Po odbiałczeniu wątroby metodą wolframianową fazę wodną poddawano ekstrakcji chloroformem i octanem etylu po jej zakwaszeniu ($\text{pH} = 1$), a następnie octanem etylu i eterem etylowym po alkalizacji ($\text{pH} = 9$) kwaśnej fazy wodnej. Krzywe spektrofotometryczne wyciągów eterowo-kwaśnych w 0,5 M amoniaku wykazywały maksima absorbancji przy 240 nm, tak jak barbiturany [5], a krzywe wyciągów chloroformowo-alkalicznych w etanolu posiadały przebieg charakterystyczny dla johimbiny [6] już po 7 dniach procesów gnilnych wątroby (rycina 14). Substancja posiadająca krzywą johimbiny została nazwana w Instytucie Ekspertyz Sądowych pseudojohimbina, ale obecnie jest ona znana jako mieszanina tryptaminy i innych amin. Biologiczne tło wątroby w czasie jej rozkładu gnilnego zostało również zbadane metodą chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) [7, 17] i chromatografii gazowej (GC) [9, 10] w różnych warunkach chromatograficznych. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że mimo różnic pochodzących od indywidualnych cech każdej wątroby, zaobserwowano dla wszystkich zastosowanych metod wyosabniania i detekcji powtarzalne cechy wspólne, tworzące tło biologiczne.

TRWAŁOŚĆ LEKÓW W MATERIALE SEKCYJNYM

W celu zbadania zmian, jakim ulegają nietrwałe związki podczas przechowywania, poddano analizie ilościowej tiorydazynę i imipraminę zawarte łącznie w ekstraktach z materiału biologicznego. Oznaczenia tych leków dokonano bezpośrednio po przeprowadzonej ekstrakcji, a następnie po miesięcznym przechowywaniu tych ekstraktów w lodówce. W niektórych ekstraktach imipramina rozłożyła się nawet w 45%, a tiorydazyna w 34% [12].

Znacznie trwalsza okazała się strychnina. W przypadku zejścia śmiertelnego 14-letniego chłopca w 1944 r., ekshumację zwłok przeprowadzono w 1948 r., a analizę toksykologiczną w 1951 r. W badanym materiale stwierdzono obecność strychniny [16]. Morfinę i jej pochodne wykrywano w ekshumowanych zwłokach po 8 latach od zgonu [43], a kokainę (1,24 ng/mg) i jej główny metabolit – benzoilokgoninę (0,37 ng/mg) oznaczono we włosach mumii peruwiańskiej po 1000 latach od zgonu zmumifikowanej osoby [28].

Te trzy wymienione przykłady powinny być rozważane jako wyjątki, a nie jako zasada. Rozkład pośmiertny nie dotyczy tylko lotnych związków, ale również wielu innych substancji, np. benzodiazepin, trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych i fenotiazyn. Wiele nielotnych związków, w tym leków, może być metabolizowana przez mikroorganizmy w czasie procesów rozkładowych. Według Robertsona i Drummera [44] nitrobenzodiazepiny – klonazepam, nitrazepam i flunitrazepam są metabolizowane do ich odpowiednich 7-amino metabolitów w wątrobie, płucach, mięśni sercowym, nerkach i mięśniach szkieletowych przez rodzaje *Enterobacter*. W przeciwieństwie współczesne badania wskazują, że znaczne ilości „endogennych” benzodiazepin (np. desmetylodiazepam, diazepam) można wykryć u pacjentów z encefalopatią wątrobową, u których nie stosowano żadnej premedykacji benzodiazepinami. Pochodzenie „endogennych” benzodiazepin nie jest jasne. Jest możliwe, że flora jelitowa i (lub) komórki ssaków są zdolne do wytwarzania ugrupowań benzodiazepinowych [29]. Obecność benzodiazepinowych receptorów w organizmie ludzkim może stanowić potwierdzenie tej tezy. Przy interpretacji pozytywnych wyników analiz na obecność benzodiazepin dla potrzeb toksykologii sądowej powinno się wziąć pod uwagę możliwość wystąpienia „endogennych” benzodiazepin. Powyższe fakty wskazują na konieczność oznaczania metabolitów leków w celu wyznaczenia stosunku stężeń lek macierzysty/metabolit, pomocnego do interpretacji uzyskanych wyników.

PODSUMOWANIE

Wszystkie przedstawione kierunki badań pozostają w związku ze zmieniającą się pośmiertnie matrycą, jaką jest dla badań chemiczno-toksykologicznych materiał tkankowy podlegający przemianom pośmiertnym. Znajomość tych przemian i towarzyszących im procesów jest niezbędne dla prawidłowej interpretacji wyników analizy chemiczno-toksykologicznej dla potrzeb toksykologii sądowej.