

Analiza alkohola u postmortalnim uzorcima

Gustovarac, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:081984>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Adriana Gustovarac

**ANALIZA ALKOHOLA U
POSTMORTALNIM UZORCIMA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Adriana Gustovarac

**ANALIZA ALKOHOLA U
POSTMORTALNIM UZORCIMA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentorica: doc. dr. sc. Sanja Mandić, spec. med. biochem. i lab. med.

Rad ima 38 stranica i 15 slika.

Zahvala

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Sanji Mandić na izdvojenom vremenu, susretljivosti, nesebičnoj pomoći i iznimnom vodstvu, koja mi je svojim stručnim pristupom, usmjeravanjem i velikim trudom koji je uložila uvelike olakšala izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju, ljubavi i podršci koju su mi nesebično pružali za vrijeme studiranja i time ga učinili lakšim.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima i bratu bez čijeg bi odricanja i neslomljive vjere u moj uspjeh put ka diplomi bio neusporedivo teži.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 ETILNI ALKOHOL.....	1
1.1.1 MEHANIZAM DJELOVANJA.....	1
1.1.2 FARMAKOKINETIKA	2
1.1.3 TOKSIČNI UČINCI.....	4
1.2 POSTMORTALNO STVARANJE ALKOHOLA	4
1.3 POSTMORTALNI UZORCI ZA ANALIZU ETILNOG ALKOHOLA.....	5
1.3.1 KRV	5
1.3.2 MOKRAĆA	6
1.3.3 OČNA VODICA	6
1.3.4 BEDRENI MIŠIĆ.....	7
1.4 METODE ODREĐIVANJA ETILNOG ALKOHOLA.....	7
1.4.1 ENZIMSKA METODA	7
1.4.2 HEADSPACE PLINSKA KROMATOGRAFIJA S PLAMENO-IONIZACIJSKIM DETEKTOROM	7
1.4.3 NICLOUXOVA METODA	9
2. HIPOTEZA	10
3. CILJEVI.....	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1 USTROJ STUDIJE	12
4.2 MATERIJALI.....	12
4.3 METODE.....	12
4.3.1 PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU	12
4.3.2 ANALIZA UZORAKA.....	15
4.4 STATISTIČKE METODE.....	16
5. REZULTATI.....	17
6. RASPRAVA	21
7. ZAKLJUČAK	24
8. SAŽETAK.....	25
9. SUMMARY	26
10. LITERATURA.....	27
11. ŽIVOTOPIS	30

Popis kratica:

SŽS	središnji živčani sustav
GABA	gama (γ) aminomaslačna kiselina (engl. <i>γ-aminobutiric acid</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
ADH	alkoholna dehidrogenaza
ER	endoplazmatski retikulum
EtG	etil glukuronid
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
NaF	natrijev fluorid
BAC	koncentracija alkohola u krvi (engl. <i>blood alcohol concentration</i>)
UAC	koncentracija alkohola u urinu (engl. <i>urine alcohol concentration</i>)
NAD ⁺ /NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
FID	plameno ionizacijski detektor (engl. <i>flame ionization detector</i>)
TCA	trikloroocetna kiselina
HS-GC-FID	<i>Headspace</i> plinska kromatografija spregnuta s plameno-ionizacijskim detektorom

Popis slika:

Slika 1. Shema *headspace* plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (izradila autorica)

Slika 2. Uzorci korišteni za analizu (slika autorice)

Slika 3. Uzorak bedrenog mišića prije usitnjavanja (slika autorice)

Slika 4. Usitnjavanje uzorka (slika autorice)

Slika 5. Vaganje uzorka (slika autorice)

Slika 6. Kromsumporna kiselina (slika autorice)

Slika 7. Destilacija uzorka (slika autorice)

Slika 8. Destilat bedrenog mišića (slika autorice)

Slika 9. Siemens Viva-E kemijski analizator (slika autorice)

Slika 10. Usporedba pojedinačnih parova koncentracija alkohola u očnoj vodici i u krvi

Slika 11. Usporedba pojedinačnih parova koncentracija alkohola u krvi i u bedrenom mišiću

Slika 12. Usporedba rezultata koncentracija alkohola izmjerenih u očnoj vodici i u krvi Passing-Bablok regresijskom analizom

Slika 13. Usporedba rezultata koncentracija alkohola izmjerenih u krvi i u mišiću Passing-Bablokovom regresijskom analizom

Slika 14. Bland-Altmanov prikaz podataka usporedbe mjerenja koncentracije alkohola u uzorcima očne vodice i krvi

Slika 15. Bland-Altmanov prikaz podataka usporedbe mjerenja koncentracije alkohola u uzorcima krvi i mišića

1. UVOD

1.1 ETILNI ALKOHOL

Kada se govori o alkoholu kao sredstvu zlouporabe, najčešće se misli na etilni alkohol. Etilni alkohol, odnosno etanol, najpoznatiji je član alkoholne skupine organskih spojeva. Pri standardnim uvjetima, bezbojna je i bistra tekućina, ugodna mirisa i specifična okusa. Vrlo je hlapljiva i zapaljiva tekućina gustoće $0,7893 \text{ g/cm}^3$ s vrelištem $78,2 \text{ }^\circ\text{C}$ te talištem $-114,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Molekula etanola ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) sadrži hidroksilnu skupinu vezanu na kratki ugljikovodični lanac (alkilnu skupinu), što ga čini polarnom molekulom, zbog čega se u potpunosti otapa u vodi.

Etanol je danas u širokoj upotrebi. Najčešće se koristi kao otapalo u mnogim granama industrije, a u medicinskoj praksi najčešće služi kao dezinficijens. Ipak, najpoznatiju primjenu ima u prehrambenoj industriji gdje je glavni sastojak svih alkoholnih pića, a dobiva se alkoholnim vrenjem uz pomoć mikroorganizama (gljivica) iz šećera (1).

1.1.1 MEHANIZAM DJELOVANJA

Alkohol se u organizmu, poput nekih opojnih droga, ponaša kao depresor središnjeg živčanog sustava (SŽS). Smatra se kako učinak ostvaruje prvo mijenjajući svojstva membrane neurona, što se naziva fluidizacijom. Pojam fluidizacija neuronske membrane označava promjene u strukturi uzrokovane molekulskim „napadima“ na membranu, što onemogućava normalan protok iona, odnosno ometa komunikaciju među neuronima (2). Nakon prolaska kroz membranu, etanol djeluje na enzime te se naposljetku veže na receptore za acetilkolin, serotonin, GABA receptore (GABA, engl. *γ -aminobutiric acid*), glicinske i N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore kojima mijenja primarne kemijske funkcije. Smatra se da etanol aktivira GABA-ergične i dopaminske, a inhibira NMDA i kolinergične receptore i na taj način ostvaruje depresiju SŽS-a (3). Konzumacija alkohola, tj. etanola, duboko je ukorijenjena u kulturu mnogih naroda, stoga je alkoholizam, odnosno njegova kronična zlouporaba, društveno prihvatljiv i najrasprostranjeniji oblik ovisnosti. Pri nižim koncentracijama u krvi, alkohol izaziva intenzivan osjećaj euforije i socijalne pripadnosti te pričljivosti i samopouzdanja, što konzumente obično tjera da nastave s daljnjim uživanjem alkoholnih pića. Porastom koncentracije nastupa uzbuđenje, koje zatim prelazi u konfuziju, dezorijentiranost, tupost, dolazi do gubitka motoričkih funkcija, a zatim i kome, što u konačnici može dovesti i do smrtnog ishoda (4).

Zbog brojnih neželjenih učinaka na stanje svijesti, u mnogim zemljama zakonski je propisana granica koncentracije alkohola u krvi iznad koje nije dopušteno upravljati vozilima. U Republici Hrvatskoj prema Zakonu o sigurnosti prometa na cestama ta granica iznosi 0,50 g/kg, odnosno odgovarajući iznos miligrama u litri izdahnutog zraka (5). Važno je napomenuti kako ta granica iznosi 0 g/kg za vozače C1, C1E, C, CE, D1, D1E, D, DE i H kategorije vozila, instruktore vožnje, mlade vozač (vozače do navršene 24. godine), kao i za vozače vozila B kategorije kada upravljaju vozilom u profesionalne svrhe (6). Također, nultu stopu tolerancije na alkohol propisuje i Zakon o sigurnosti na radnom mjestu (7).

1.1.2 FARMAKOKINETIKA

APSORPCIJA

Alkohol je mala polarna molekula, hidrofilnih i lipofilnih svojstava pa se stoga brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, lako prolazi biološke membrane te raspodjeljuje po tijelu. Kada se oralnim putem unese u organizam (najčešći put unosa), zbog navedenih svojstava vrlo lako i brzo prelazi u krv. Alkohol na svome putu kroz organizam prvo dospijeva u želudac, gdje se apsorbira 20 % unesene količine (8). Neki čimbenici poput količine hrane u želucu, volumnog udjela alkohola u alkoholnom piću ili spola utječu na brzinu apsorpcije, pa će se alkohol tako apsorbirati brže ako je konzumiran natašte u odnosu na količinu konzumiranu na pun želudac (9). Zbog razlike u tjelesnoj masi i količini želučanog enzima – alkoholne dehidrogenaze (ADH) – odgovornog za metabolizam alkohola, između muškaraca i žena ista količina uzetog alkohola neće se apsorbirati u jednakoj količini. Kod žena će količina apsorbiranog alkohola biti veća, stoga će i koncentracija alkohola u krvi biti veća te učinak jače izražen (10). Također, pića s volumnim udjelom alkohola 20 – 30 %, apsorbirat će se brže od pića s volumnim udjelom alkohola iznad 30 % kod obaju spolova (11). Nakon početne apsorpcije u želucu, alkohol na svome putu kroz organizam dospijeva u tanko crijevo, odakle se, zbog velike površine crijeva, u krvotok apsorbira 80 % ukupno uzetog alkohola (8).

DISTRIBUCIJA

Alkohol se kroz organizam kreće pasivnom difuzijom. Budući da je hidrofilan, odlazi u tkiva s većim volumnim udjelom vode. Zato se najviše koncentracije alkohola nalaze u krvi, slini i urinu. S obzirom na to da se krv sastoji od 80 % vode, organi koji su jače prokrvljeni sadržavat će veću količinu alkohola. Distribucija alkohola također ovisi i o spolu te tjelesnoj

masi. S obzirom na to da se alkohol slabije otapa u lipidima, sporije će se distribuirati kod žena nego kod muškaraca jer prirodno imaju viši postotak masnog tkiva, a manji udio vode. Isto vrijedi i za pretilo osobe koje, neovisno o spolu, imaju viši udio masnog tkiva te će se kod njih alkohol također sporije distribuirati (12). Nakon konzumacije, alkohol se vrlo brzo može naći u svim organima pa tako i u plućima (alveolama), zbog čega ga se može uočiti u izdahnutom zraku (Drägerov alkotest). Alkohol lako prolazi sve biološke membrane, pa tako i krvno moždanu te placentarnu kod trudnica. Zbog opasnosti od razvijanja alkoholnog fetalnog sindroma, trudnicama se ne preporučuje konzumacija alkoholnih pića (13).

METABOLIZAM

Metabolizam alkohola odvija se reakcijama nultog reda, što znači da je brzina uklanjanja alkohola iz organizma u korelaciji s vremenom i ne ovisi o njegovoj koncentraciji u krvi. 2 – 10 % alkohola iz organizma izlučuje se nepromijenjeno plućima, mokraćom te znojem dok će se 90 – 98 % metabolizirati enzimima u jetri (9). Enzimi odgovorni za metabolizam alkohola jesu alkoholna dehidrogenaza (ADH) i CYP2E1 iz skupine citokroma P450. ADH, citoplazmatski enzim koji se najvećim dijelom nalazi u jetri te manjim dijelom u želucu i CYP2E1 koji se nalazi na glatkom endoplazmatskom retikulumu (ER) stanica svih organa, oksidiraju etanol u toksični acetaldehid. Acetaldehid se u organizmu stvara polagano, te se nakon nastanka brzo oksidira u netoksični acetat (11). Acetat se spaja s koenzimom A kako bi nastao acetil koenzim A koji je glavni supstrat ciklusa limunske kiseline u kojem će nastati ugljični dioksid (CO_2) i voda – krajnji proizvodi metabolizma etanola (14).

ELIMINACIJA

Većina alkohola iz organizma (oko 95 %) uklanja se metabolizmom uz pomoć jetrenih enzima, a tek mali dio izlučuje se nepromijenjen, najčešće bubrezima tj. urinom, zatim znojenjem, disanjem te konjugacijom s glukuronskom kiselinom, pri čemu nastaje etil glukuronid (EtG) koji se u novije vrijeme sve češće koristi kao biomarker akutne intoksikacije etanolom. Eliminacija alkohola se, za razliku od metabolizma, odvija reakcijama prvog reda, što znači da se alkohol brže eliminira što je doza, odnosno koncentracija u krvi, viša (14, 15).

1.1.3 TOKSIČNI UČINCI

Toksični učinci etanola očituju se već pri uzimanju manjih doza, kada se pojavljuju prvi znakovi depresije SŽS-a poput psihičke relaksacije, a s povećanjem doze dolazi i do poremećaja motoričke koordinacije i/ili gubitka svijesti te se tad govori o akutnoj toksičnosti. Budući da etanol primarno djeluje na središnji živčani sustav, u slučaju predoziranja može u krajnjem slučaju doći do smrti zbog aresta dišnog sustava. Kod hospitalizirane akutne intoksikacije etanolom, laboratorijski se prate glukoza, magnezij i kalij, kao i gubitak tekućina. Pacijentu je bitno, ako je potrebno, napraviti lavažu želuca te održavati vitalne funkcije. Ako je pacijent u teškom kliničkom stanju, radi se i hemodijaliza (2).

Kronična zloraba alkohola vodi do oštećenja svih organskih sustava. Kronična toksičnost očituje se, među ostalim, oštećenjem gastrointestinalnog trakta (oštećenja i ulceracije želučane sluznice, pankreatitis), jetrenim oštećenjima (masna jetra i ciroza), oštećenjima miokarda (hipertenzija, ishemična bolest srca, alkoholna kardiomiopatija, infarkt) te oštećenjima SŽS-a (epilepsija, neuropsihijatrijske bolesti). Alkohol također ima i kancerogena svojstva. Međunarodna agencija za istraživanje raka Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization* – WHO), svrstala je acetaldehid (metabolit etanola) u prvu grupu tvari kancerogenih za čovjeka (13).

1.2 POSTMORTALNO STVARANJE ALKOHOLA

Postmortalno stvaranje alkohola važan je čimbenik pri forenzičnom toksikološkom vještačenju u sudskoj medicini. Prisustvo etanola u forenzičnom nalazu najčešće znači određenu kaznenopravnu odgovornost, stoga se analizi i interpretaciji nalaza pristupa vrlo oprezno. No nalaz etanola u biološkom uzorku ne znači uvijek da je osoba bila alkoholizirana u trenutku nesreće jer se etanol može stvoriti i postmortalno. Pregledom literature, utvrđeno je da postoji više načina postmortalnog stvaranja etanola u prikupljenim uzorcima. Alkohol se u uzorcima za forenzično-toksikološku analizu može stvoriti:

- a) uslijed konzumacije alkoholnih pića neposredno prije smrti (najčešće)
- b) difuzijom iz drugih organa nakon što je već nastupila smrt
- c) *in vitro* uz pomoć mikroorganizama
- d) endogeno uz pomoć mikroorganizama za vrijeme života (16).

Kako je ranije spomenuto, alkohol je hidrofilna molekula, a kroz tijelo se giba difuzijom i prelazi u tkiva koja imaju viši udio vode. Postmortalnom difuzijom alkohol će iz želuca (ako ga je osoba konzumirala prije trenutka smrti) prijeći u okolna tkiva koja imaju viši udio vode, čime će se podići njegova koncentracija u tim tkivima. Za neoformaciju etanola u tijelu prije i nakon smrti, potreban je supstrat. Kako etanol uobičajeno nastaje fermentacijom iz ugljikohidrata posredstvom nekih mikroorganizama, u tijelu će također nastati iz ugljikohidrata, najčešće iz glukoze, posebice kada su njene vrijednosti uslijed nekih stanja (poput šećerne bolesti) povišene. Oko 1 mol glukoze, u tom slučaju, služi kao supstrat za pretvorbu u 2 mola alkohola. Poseban oprez pri uzorkovanju i interpretaciji nalaza potreban je kada se rukuje uzorcima osoba preminulih nasilnom smrću ili ako su na tijelu već nastupile truležne promjene. Tada se zbog perforacije organa i ulaska mikroorganizama u tjelesne sustave, u uzorcima *in vitro* mogu stvoriti lažno povišene vrijednosti etanola (15). Slično vrijedi i za osobe koje su prije smrti bolovale od nekih upalnih stanja posredovanih mikroorganizmima jer isti također mogu stvoriti lažno povišenje vrijednosti etanola u uzorku. Neki od mikroorganizama koji mogu fermentirati etanol, a prirodno su prisutni u ljudskom tijelu kao dio tjelesne mikrobiote su: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, mikroorganizmi iz porodice *Staphylococcus*, itd. Kako bi se spriječio porast mikroorganizama koji proizvode etanol, važno je što hitnije prikupiti uzorke preminuloga na odgovarajući način, pazeći na mogućnost kontaminacije. Ako uzorke nije moguće odmah prikupiti, tijelo bi trebalo pohraniti na temperaturu koja će spriječiti truležne promjene te inhibirati aktivnost mikroorganizama sposobnih za stvaranje alkohola. Uzorke bi također trebalo prikupljati uz natrijev fluorid (NaF) kao konzervans te, ako ih nije moguće odmah obraditi, pohraniti na temperaturu od 0 do 4 °C. Prisutnost 1-propanola, n-butanola i 2-propanola uz etanol na forenzičnom nalazu može ukazati na njegovu mikrobijalnu etiologiju kao i koncentracija od 0,1 g/L u krvi, bez nalaza u urinu i/ili očnoj vodici (9, 17).

1.3 POSTMORTALNI UZORCI ZA ANALIZU ETILNOG ALKOHOLA

1.3.1 KRV

Krv je važan uzorak za toksikološku analizu zbog toga što u njoj izmjerena koncentracija izravno korelira s farmakološkim, odnosno toksičnim učinkom. Za postmortalne toksikološke analize krv se uzima iz femoralne vene zbog toga što je taj dio tijela najmanje podložan truležnim promjenama te najdulje ostaje očuvan. Iznimno, kada nije moguće prikupiti uzorak krvi iz femoralne vene, uzima se uzorak krvi iz srčanog mišića iako u tom uzorku razina

alkohola može biti lažno povišena zbog difundiranja iz želuca. Uzorci se uzimaju uz NaF kao stabilizator. Krv, kao i sve druge prikupljene biološke uzorke, nužno je pregledati, propisno označiti i analizirati u što kraćem roku ili adekvatno pohraniti do analize (na 4 °C ili -20 °C, ovisno o vremenu koje će proći do analize) (18).

1.3.2 MOKRAĆA

Iz mokraće je moguće opaziti većinu ksenobiotika koji su se metabolizirali u tijelu, a zbog svojih svojstava i jednostavnosti prikupljanja, drugi je najčešći odabrani uzorak u toksikološkim analizama, posebice kod živih osoba. Postmortalno se prikuplja punkcijom mokraćnog mjehura, poštujući načela sterilnosti. Biološke uzorke urina i krvi trebalo bi, kada je god to moguće, prikupiti istovremeno. Na temelju odnosa koncentracije alkohola u krvi (engl. *blood alcohol concentration* – BAC) i u urinu (engl. *urine alcohol concentration* – UAC) moguće je dati procjenu stanja apsorpcije u organizmu, što je polazište za procjenu vremena konzumacije alkohola pri forenzičnom vještačenju. Ponekad nalaz alkohola u urinu može biti značajno povišen u odnosu na nalaz alkohola u krvi, što može značiti da je preminuli u fazi eliminacije ili da se etanol stvorio postmortalno. Budući da se etanol postmortalno stvara, najčešće iz glukoze uz posredovanje mikroorganizama, u tom je slučaju poželjno poznavati anamnezu preminuloga, a posebice stanja i bolesti u kojima je glukoza povišena poput *diabetesa mellitusa*. Kada anamneza preminulog nije poznata, mjeri se razina glukoze u očnoj vodici (18, 19).

1.3.3 OČNA VODICA

Očna vodica želatinasta je tvar koja se nalazi u stražnjoj strani očne jabučice te sadrži 98 – 99 % vode. Ne sadrži krvne žile, a od šarenice je dijeli krvno retinalna barijera, pa je očna vodica zapravo ultrafiltrat krvi, tj. krvne plazme. Pravilnik o uvjetima i načinu uzimanja krvi i urina od okrivljenika i drugih osoba Ministarstva unutarnjih poslova RH nalaže istovremeno uzorkovanje očne vodice s uzorcima krvi i urina. Prednost očne vodice u odnosu na ostale biološke uzorke jest njezina anatomska udaljenost od probavnog sustava, stoga je mogućnost kontaminacije uzorka bakterijama koje nose rizik od postmortalne sinteze alkohola i posljedično lažno povećanih koncentracija alkohola na nalazu vrlo niska, što je važno kod vještačenja osoba kod kojih je ozbiljna trauma uzrokovala smrt ili kod tijela s vidljivim truležnim promjenama. Kod takvih i sličnih situacija, kada se ne može pristupiti uzorkovanju krvi i urina, očna vodica postaje uzorak izbora jer je izoliran medij. Očna se vodica vrlo lako uzorkuje i ne zahtijeva posebnu pripremu prije analize. Uzima se tankom sterilnom iglom tako da se okomito uđe u vanjski kut očne jabučice te aspirira 2 – 5 ml sadržaja u špricu (20).

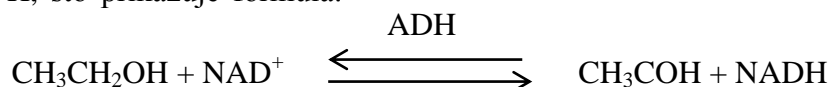
1.3.4 BEDRENI MIŠIĆ

Bedreni mišić nekonvencionalan je uzorak za postmortalnu analizu alkohola te ga se koristi kada nije moguće prikupiti uzorke krvi, i/ili očne vodice, a to je najčešće kod preminulih osoba čije je tijelo uvelike truležno izmijenjeno. Prikuplja se u količini od 30 g, od čega se 1 g priprema destilacijom za analizu. Ako je uzorak potrebno pohraniti, to se čini na temperaturi od 4 °C. Bedreni mišić, kao i drugi skeletni mišići, sadrži glikogen koji se nakon smrti pretvara u glukozu koja čini supstrat za mikrobima posredovanu sintezu alkohola, što može rezultirati lažno povišenom koncentracijom alkohola, stoga je interpretaciji takvog nalaza potrebno pristupiti oprezno (21,22).

1.4 METODE ODREĐIVANJA ETILNOG ALKOHOLA

1.4.1 ENZIMSKA METODA

Enzimska metoda određivanja alkohola u biološkim uzorcima zasniva se na principu spektrofotometrijskog praćenja reakcije oksidacije etanola u acetaldehid. Alkoholna dehidrogenaza u uzorku oksidira etanol u acetaldehid uz istovremenu redukciju koenzima NAD^+ u NADH , što prikazuje formula:



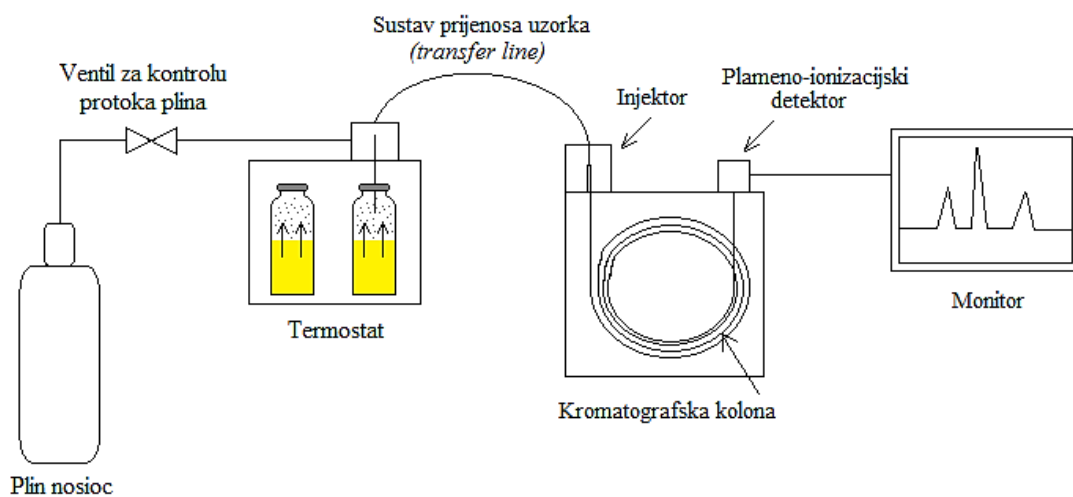
Instrumentalno se, na analizatorima mjeri apsorbancija, odnosno porast iste pri valnoj duljini od 340 nm. Porast apsorbancije proporcionalan je koncentraciji alkohola u uzorku (23).

1.4.2 HEADSPACE PLINSKA KROMATOGRAFIJA S PLAMENO-IONIZACIJSKIM DETEKTOROM

Headspace plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (HS-GC-FID) jest tehnika analize hlapljivih spojeva koja se temelji na prevođenju uzorka u plinovitu fazu zagrijavanjem (termostatiranjem), dok se u bočici s uzorkom razrijeđenim odgovarajućim otapalom (uglavnom voda) ne postigne stanje ravnoteže (ekvilibrija). Nakon postignute ravnoteže između tekuće ili krute faze uzorka i plinovite faze iznad uzorka, dio plinovite faze injektira se u plinski kromatograf (*headspace* tehnika), gdje se analiti iz uzorka razdvajaju. Injektiranje uzorka u plinski kromatograf postiže se tako da plin nosilac, koji stalno prolazi kroz sustav prijenosa uzorka (*transfer line*), čime se izbjegava kontaminacija, kroz grijanu

iglu *headspace* sustava tlačí sadržaj bočice do definiranog pritiska. Pod pritiskom, plinovita faza uzorka ulazi u kolonu kromatografa, gdje se odvija kromatografsko razdvajanje.

Princip plinske kromatografije temelji se na razdvajanju analita na sastavnice koje ga sačinjavaju ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Razdvajanje te smjese odvija se na temperaturi do 400 °C u koloni plinskog kromatografa koja je stacionarna faza, a analit u plinovitom stanju jest dio mobilne faze koja putuje kroz nju. Nakon razdvajanja, analiti se uočavaju na detektoru koji može biti selektivni ili univerzalni, ovisno o potrebama analize. Za analizu alkohola HS-GC sustavom, kao i za većinu organskih spojeva, najčešće se koristi plameno ionizacijski detektor (FID – engl. *flame ionization detector*). Uočavanje se temelji na potpunome izgaranju (pirolizi) uzorka u plamenu smjese vodika i zraka, gdje ugljikovi atomi iz organske tvari stvaraju ione koji daju signal koji se mjeri i proporcionalan je količini ugljikovih atoma u uzorku, odnosno koncentraciji alkohola na nalazu. Rezultat analize dobiva se u obliku kromatograma (grafičkog prikaza odziva detektora) na kojima se očitavaju vršci (pikovi) čija površina odgovara količini neke tvari te retencijskom vremenu (vremenu zadržavanja) koje je specifično za svaku pojedinu tvar iz smjese u određenim uvjetima, a na temelju čega se radi konačna identifikacija i kvantifikacija. Shema HS-GC-FID uređaja prikazana je na slici 1. (24).



Slika 1. Shema *headspace* plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (izradila autorica)

1.4.3 NICLOUXOVA METODA

Niclouxova metoda danas je slabo zastupljena metoda određivanja apsolutnog alkohola u forenzične svrhe, a širu primjenu nalazi uglavnom u laboratorijima koji nemaju HS-GC-FID uređaj (20). Metoda se temelji na destilaciji tkiva (najčešće bedrenog mišića) uz pomoć kromsumporne kiseline. Destilat kasnije služi kao uzorak koji se analizira enzimskom metodom na imunolokemijskom analizatoru.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da se koncentracija alkohola izmjerena u destilatu bedrenog mišića može koristiti za pouzdanu procjenu koncentracije alkohola u krvi.

3. CILJEVI

Glavni cilj:

Ovim istraživanjem koje obuhvaća analizu alkohola u krvi, očnoj vodici i destilatu bedrenog mišića trebalo bi procijeniti može li se koncentracija alkohola u destilatu bedrenog mišića koristiti za pouzdanu procjenu koncentracije alkohola u krvi.

Specifični ciljevi:

1. Usporediti vrijednosti koncentracija alkohola u očnoj vodici i u krvi.
2. Usporediti vrijednost koncentracija alkohola u krvi i u destilatu bedrenog mišića.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 USTROJ STUDIJE

Provedeno je presječno istraživanje.

4.2 MATERIJALI

Za istraživanje su se koristili uzorci krvi (iz femoralne vene) bedrenog mišića i očne vodice (prikazani na slici 2.) prikupljeni tijekom obdukcije u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku, a prema sudskom nalogu u svrhu određivanja koncentracije alkohola. Uzorci su se prikupljali tijekom razdoblja od tri mjeseca. Svi su uzorci analizirani nakon primitka.



Slika 2. Uzorci korišteni za analizu (slika autorice)

4.3 METODE

4.3.1 PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

KRV

Neposredno prije analize uzorka krvi na analizatoru, krv se deproteinizira uz dodatak dva količinska udjela 30 %-tne trikloroctene kiseline (TCA, formula: $C_2HCl_3O_2$) prethodno razrijeđene u omjeru 1 : 5. Deproteiniziranu krv se zatim centrifugira tijekom 5 minuta na 3500 okr/min. Za analizu koncentracije alkohola koristi se dobiveni supernatant.

OČNA VODICA

Očna vodica analizira se na analizatoru bez prethodne pripreme.

BEDRENI MIŠIĆ

Kako bi se mogao analizirati, uzorak bedrenog mišića prvo je potrebno destilirati. Prije postupka destilacije, uzorak je potrebno usitniti, nakon čega se uzima 5 g mišića koji će se koristiti za analizu (slika 5.). Navedenu količinu preporučljivo je uzeti iz središnjeg dijela zaprimljenog materijala (prikazano na slikama 3. i 4.) zbog toga što je čistoća u tom dijelu nešto veća, pa je i rezultat analize time točniji.



Slika 3. Uzorak bedrenog mišića prije usitnjavanja (slika autorice)



Slika 4. Usitnjavanje uzorka (slika autorice)

Nakon vaganja uzorka, menzutom se odmjeri 30 ml kromsumporne kiseline (slika 6.) te se sastavi aparatura za destilaciju prikazana na slici 7. Odvagan uzorak bedrenog mišića te sadržaj menzure prebaci se u tikvicu za destilaciju koja se zatim ravnomjerno zagrijava. Para iznad smjese hladi se i ukapljuje te se u graduiranu posudicu skuplja 10 ml destilata (slika 8.) koji se dalje analizira enzimskom metodom. Za procjenu stanja alkoholiziranosti koristi se formula kako slijedi:

$$\frac{\text{Koncentracija alkohola u destilatu} \times 2}{0,81}$$

Tako izračunata koncentracija predstavlja koncentraciju za koju se očekuje da bi bila izmjerena u krvi, te se koristi prilikom interpretacije za procjenu stanja alkoholiziranosti.



Slika 5. Vaganje uzorka (slika autorice)



Slika 6. Kromsumporna kiselina (slika autorice)



Slika 7. Destilacija uzorka (slika autorice)



Slika 8. Destilat bedrenog mišića (slika autorice)

4.3.2 ANALIZA UZORAKA

Analiza se provodila na uređaju VIVA E (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, USA) (slika 9.) u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek (slika 9.). Princip rada uređaja zasniva se na mjerenju porasta apsorbancije nakon kemijske reakcije pretvorbe etilnog alkohola u acetaldehid uz pomoć alkoholne dehidrogenaze uz istovremenu redukciju NAD^+ do NADH pri 340 nm. Reagensi koji su se koristili za analizu su Emit[®] II plus Ethyl Alcohol Assay reagens 1 koji sadržava tris pufer, sufraktante i konzervanse te

Emit® II plus Ethyl Alcohol Assay reagens 2 koji sadržava ADH, koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), pufer, konzervanse i stabilizatore. Prije analize bilo je potrebno napraviti unutarnju kontrolu te kalibraciju uređaja kako bi se dobili pouzdani nalazi.



Slika 9. Siemens Viva-E kemijski analizator (slika autorice)

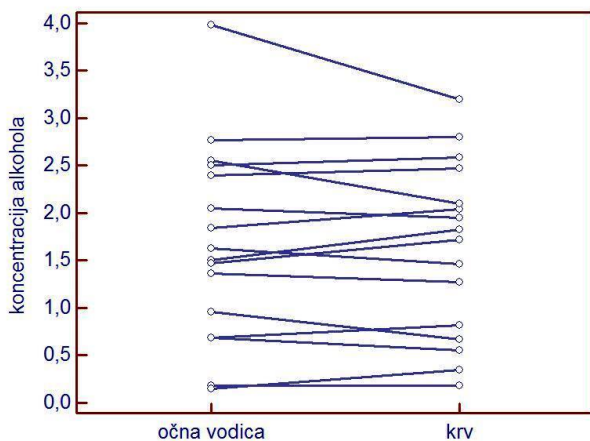
4.4 STATISTIČKE METODE

Rezultati analize obrađeni su statističkim programom MedCalc verzija 12.4.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Za prikaz podataka korištena je deskriptivna statistika. Raspodjela podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Budući da su podatci slijedili neparametrijsku raspodjelu, prikaz razlike u vrijednostima između dvije serije zavisnih podataka proveden je pomoću Wilcoxonovog testa. Passing-Bablokova regresijska analiza te Bland-Altmanov prikaz podataka koristili su se za obradu i prikaz podataka dobivenih iz različitih vrsta uzoraka. $P < 0,05$ je predstavljao razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata.

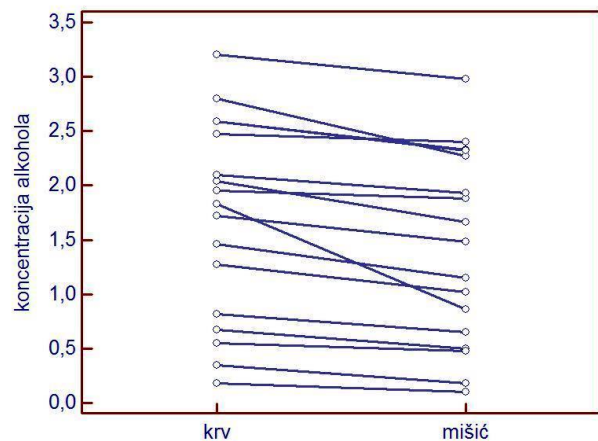
5. REZULTATI

Ovim istraživanjem analizirani su uzorci očne vodice, krvi i bedrenog mišića dobiveni tijekom obdukcije 23 preminule osobe (kadavera). Šest kadavera imalo je koncentracije alkohola u očnoj vodici i u krvi manje od granice kvantifikacije ($< 0,03$ g/L) pa su oni isključeni iz daljnje statističke obrade rezultata. Od njih šestoro, dvoje je imalo koncentraciju alkohola u mišiću manju od $0,03$ g/L, dok ih je četvero imalo koncentracije alkohola u rasponu od $0,14$ do $0,38$ g/L.

Usporedbom parova vrijednosti koncentracija iz različitih uzoraka pomoću Wilcoxonovog testa, utvrđena je statistički značajna razlika između krvi i mišića ($P < 0,001$), dok između očne vodice i krvi te razlike nije bilo ($P = 0,860$). Pojedinačne razlike u koncentracijama prikazane su grafički slikama 10. i 11.



Slika 10. Usporedba pojedinačnih parova koncentracija alkohola u očnoj vodici i u krvi



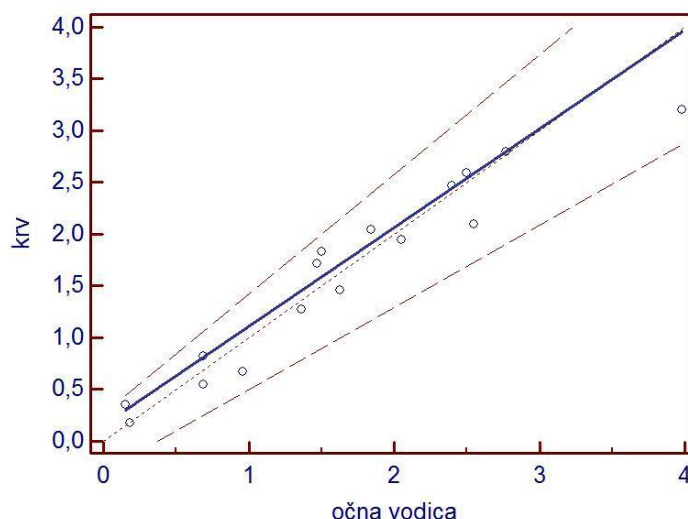
Slika 11. Usporedba pojedinačnih parova koncentracija alkohola u krvi i u bedrenom mišiću

Koncentracije alkohola u mišiću preračunate tako da odražavaju vrijednost koncentracije alkohola u krvi bile su prosječno niže od stvarno izmjerenih koncentracija u krvi. Ta razlika rezultirala je drugačijom interpretacijom nalaza stanja alkoholiziranosti kod šest kadavera. Prema koncentraciji alkohola u mišiću, njih troje bi u trenutku smrti bilo u pijanom stanju, dok bi prema izmjerenoj koncentraciji alkohola u krvi isti bili u teško pijanom stanju, dvoje bi ih bilo u pripitom stanju, a prema koncentraciji alkohola u krvi u pijanom stanju te bi jedan bio u trijeznom umjesto u pripitom stanju, kako je pokazao rezultat koncentracije u krvi.

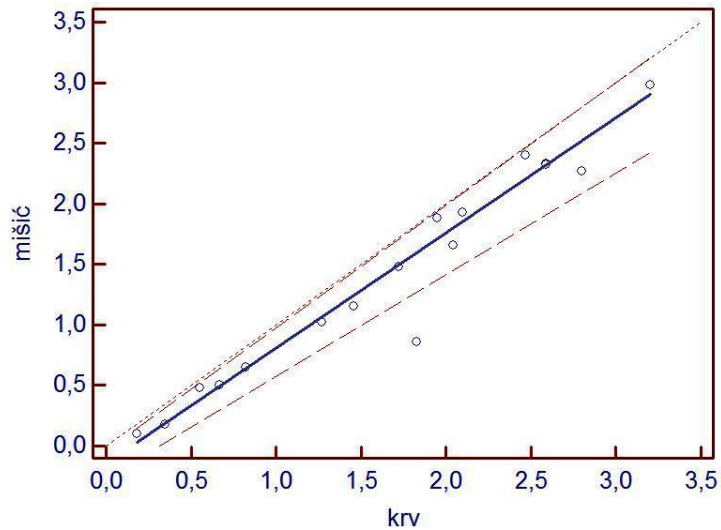
Passing-Bablokova regresijska analiza pokazuje da su koncentracije alkohola izmjerene u očnoj vodici i u krvi podudarne (slika 10.), dok između parova vrijednosti iz uzoraka krvi i mišića postoji konstantna, ali ne i proporcionalna razlika (slika 11.). Rezultati Passing-Bablokove regresijske analize prikazani su tablicom 1.

Tablica 1. Passing-Bablokova regresijska analiza

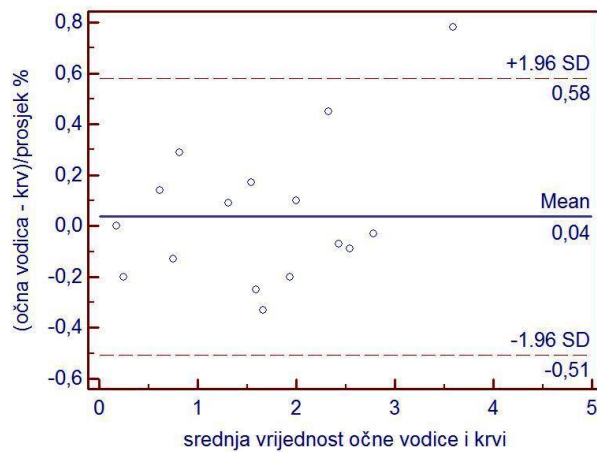
	REGRESIJSKA JEDNADŽBA	Cusum test linearnosti	PB 95%CI nagib	PB 95%CI odsječak
OČNA VODICA-KRV	$Y=0,160+0,953x$	0,58	0,79; 1,15	-0,29; 0,27
KRV-MIŠIĆ	$Y=-0,137+0,951x$	0,58	0,84; 1,01	-0,26; -0,04



Slika 12. Usporedba rezultata koncentracija alkohola izmjerenih u očnoj vodici i u krvi Passing-Bablokovom regresijskom analizom: točke predstavljaju mjerenja, puna crta predstavlja regresijski pravac, isprekidane crte granice pouzdanosti regresijskog pravca, a sitno isprekidana crta predstavlja idealan pravac

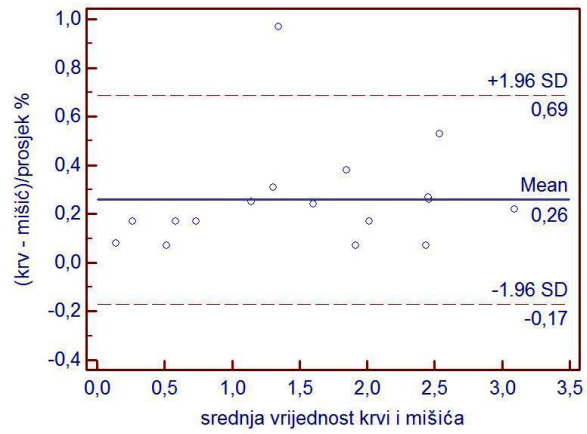


Slika 13. Usporedba rezultata koncentracija alkohola izmjerenih u krvi i u mišiću Passing-Bablokovom regresijskom analizom: točke predstavljaju mjerenja, puna crta predstavlja regresijski pravac, isprekidane crte granice pouzdanosti regresijskog pravca, a sitno isprekidana crta predstavlja idealan pravac



Slika 14. Bland-Altmanov prikaz podataka usporedbe mjerenja koncentracije alkohola u uzorcima očne vodice i krvi

Bland i Altman prikazi podataka pokazuju prosječne razlike u mjerenjima iz različitih uzoraka (slika 14. i 15.)



Slika 15. Bland-Altmanov prikaz podataka usporedbe mjerenja koncentracije alkohola u uzorcima krvi i mišića. Središnja puna linija predstavlja vrijednost razlike u mjerenjima, a gornja i donja isprekidana crta standardnu devijaciju razlike u mjerenjima

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajnu podudarnost koncentracije alkohola u očnoj vodici i krvi, dok između bedrenog mišića i krvi podudarnost nije bila zadovoljavajuća. Koncentracija je alkohola iz bedrenog mišića nakon računskog preračuna u svrhu procjene koncentracije alkohola u krvi bila prosječno niža od stvarno izmjerene koncentracije u krvi.

Prilikom davanja mišljenja o stanju alkoholiziranosti, u zaključku se navodi je li pokojnik u trenutku događaja bio u trijeznom, pripitom, pijanom ili teško pijanom stanju. To stanje odražava stanje svijesti i mogućnost koordinacije pokreta, a te su informacije vrlo bitne prilikom toksikološkog vještačenja. U konkretnom istraživanju koje je obuhvatilo 16 kadavera došlo je do nepodudarne procjene kod njih 6. Mnogo je čimbenika koji mogu biti rezultatom takvog neslaganja, no važno je napomenuti da se prilikom interpretacije takvog nalaza mišljenje mora davati s krajnjim oprezom.

Prema Članku 8. Pravilnika o uvjetima i načinu uzimanja krvi i urina od okrivljenika i drugih osoba te o uvjetima koje ovlaštene ustanove i tijela moraju ispunjavati da bi mogle obavljati poslove analize krvi i urina (NN 86/2014) iz tijela umrle osobe uz uzorak krvi obavezno se uzimaju urin i očna vodica, ako ih ima (25). Postupanje prema tom pravilniku osigurava nalaz prema kojem je moguće dati pouzdano mišljenje u toksikološkom vještačenju. U određenim okolnostima, kada nema bioloških tekućina, poštivanje tog pravilnika nije moguće. U tom se slučaju uzima tkivo bedrenog mišića. Takvo je postupanje potrebno uglavnom kada je prošlo određeno vrijeme od trenutka smrti do uzorkovanja.

Rad S. Menshawi (26) govori kako je očna vodica najbolji postmortalni uzorak za analizu alkohola nakon krvi iz femoralne vene, što je potvrdilo i ovo istraživanje. Bitno je naglasiti kako bi se očna vodica trebala uvijek analizirati kada je femoralna krv nedostupna, na neki način kontaminirana ili ako je tijelo uvelike izmijenjeno truležnim procesima. Prednost očne vodice je u tome što je kao medij anatomske udaljena od crijeva (odakle alkohol može postmortalno difundirati u krv) te sterilna, stoga manje podliježe i mikrobiološkoj kontaminaciji koja može dovesti do postmortalnog stvaranja ili razgradnje alkohola i time do pogrešne interpretacije nalaza. Također, zbog svoje anatomske izoliranosti, postoji najveća vjerojatnost da će ostati očuvana, čak i ako je tijelo već podleglo opsežnijem truljenju.

Slično potvrđuje i istraživanje Miletina M. (22) koje je također utvrdilo kako je očna vodica odgovarajuća zamjena za krv pri analizi postmortalnih uzoraka. Isto istraživanje

također daje prednost uzorcima očne vodice zbog stabilnosti samog medija, naspram uzoraka krvi koji se analiziraju s određenom vremenskom odgodom u odnosu na nesretni događaj koji zahtijeva vještačenje. Naime, očna vodica je pokazala najmanji pad koncentracije alkohola u epruveti koja je bila pohranjena šest mjeseci. Budući da etanol isparava, svi nalazi uzoraka koji se analiziraju s odgodom, trebali bi se tumačiti uz dodatan oprez.

Bedreni mišić, kako se može uočiti i u ovom istraživanju, nije posve odgovarajući uzorak za procjenu alkoholiziranosti u forenzičnoj toksikologiji. Priprema uzorka za analizu enzimskom metodom zahtijeva opsežnu pripremu, što povećava izvore potencijalnih grešaka koje mogu rezultirati procjenom iz koje će proizaći pogrešan zaključak. Bitno je naglasiti kako bedreni mišić nije uobičajeni uzorak za procjenu stanja alkoholiziranosti, već se koristi isključivo kada uzorci krvi i očne vodice nisu dostupni, kontaminirani su ili je tijelo već podleglo uznapredovanom truljenju. Potonje predstavlja mogući izvor pogrešaka koje se mogu značajno odraziti na interpretaciju nalaza. Naime, neki mikroorganizmi (poput *C. albicans*, *S. aureus*) u procesu raspadanja mišića mogu postmortalno stvoriti etanol, ali ga i razgraditi, što će dovesti do lažno povišenih ili sniženih vrijednosti. Isto tako, s obzirom na to da je etanol hlapljiva tvar, dužim stajanjem može i evaporirati iz tkiva, što može dovesti do lažno sniženih vrijednosti etanola na forenzičnom nalazu (22).

U rutinskom laboratorijskom radu za postmortalnu procjenu alkoholiziranosti koristi se HS-GC-FID. Navedena metoda predstavlja metodu izbora, dok se enzimska metoda koristi isključivo kada korištenje plinske kromatografije nije omogućeno. Prednost te tehnike u odnosu na enzimsku metodu jest mogućnost istovremene kvalitativne, odnosno kvantitativne analize i drugih alkohola koji, uz etanol, mogu nastati postmortalno. Osim toga, za analizu bedrenog mišića tom tehnikom nije potrebna opsežna priprema uzorka kao u postupku za analizu enzimskom metodom. HS-GC-FID omogućava i analizu etil glukuronida (EtG) kao markera sinteze alkohola, a istražitelji nerijetko zahtijevaju i mikrobiološku analizu zaprimljenog biološkog uzorka kako bi isključili mogućnost sinteze ili razgradnje alkohola posredovanu mikrobima (18, 27-29).

Prema radu K. Arys, na uzorcima krvi i urina te dvije metode pokazuju ekvivalentne rezultate kada se nalaze u rasponu nižih koncentracija etanola, dok se u rasponu viših koncentracija etanola primjećuju statistički značajna odstupanja, što se može pripisati interferenciji enzima s laktat dehidrogenazom (LDH) koja se prirodno nalazi u skeletnom mišiću (30). U usporedbi s HS-GC-FID metodom, ograničenje enzimske metode predstavlja i

njezina niža specifičnost. Laktat dehidrogenaza kao i laktati u višim koncentracijama dat će lažno povišene vrijednosti etanola na forenzičnome nalazu dobivenom enzimskom metodom. Povišena razina LDH-a i laktata očekivane su kod nekih kliničkih stanja poput (česte) muskuloskeletne traume, stoga bi za točnu interpretaciju bilo poželjno poznavati anamnezu preminuloga. Interferencije LDH-a i laktata, u tom slučaju, moguće je otkloniti postupcima deproteinizacije i ultra-filtracije (31-34). Dosadašnja literatura koja govori o korištenju mišića za određivanje etanola u forenzične svrhe jest oskudna, a dostupni podatci zastarjeli su.

U slučaju uzorkovanja očne vodice, bedrenog mišića kao i svih drugih bioloških uzoraka, nužno je obratiti pozornost na način prikupljanja uzoraka, kao i na njihovo skladištenje u slučaju odgođene analize, neovisno o izboru metode. U svrhu standardizacije postupaka prikupljanja i čuvanja uzoraka, propisane su smjernice za načine postupanja kojih se u svrhu održavanja kvalitete i sljedivosti potrebno pridržavati (21).

7. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazali su dobru korelaciju između nalaza koncentracija etanola iz očne vodice i krvi, dok nalazi dobiveni analizom bedrenog mišića nisu bili sukladni nalazima krvi. Koncentracije alkohola u krvi i očnoj vodici podudarne su na nalazu, a vrijednosti koncentracije alkohola u destilatu bedrenog mišića niže su u odnosu na vrijednosti iz uzorka krvi. Temeljem provedenog istraživanja zaključuje se kako se koncentracija alkohola u destilatu bedrenog mišića ne može koristiti za pouzdanu procjenu koncentracije alkohola u krvi. Ovim istraživanjem se također zaključuje kako je očna vodica adekvatan uzorak za postmortalnu analizu etanola, dok se isto ne može zaključiti za bedreni mišić te bi se on kao uzorak u forenzične svrhe trebao koristiti uz dodatan oprez.

8. SAŽETAK

Uvod: Uzorci izbora za postmortalnu analizu etilnog alkohola su venska krv uzeta iz femoralne vene i urin, a zakon nalaže istovremeno uzorkovanje i očne vodice. Iznimno, kada nije moguće prikupiti navedene uzorke, koncentracija alkohola u krvi može se procijeniti na temelju koncentracije alkohola u bedrenom mišiću.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati pouzdanost nalaza etanola iz bedrenog mišića u procjeni stanja alkoholiziranosti.

Nacrt studije: Presječno istraživanje.

Materijali i metode: Za analizu je korišteno 16 uzorka krvi, očne vodice i bedrenog mišića prikupljenih tijekom obdukcije u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku. Uzorci krvi pripremili su se deproteinizacijom s trikloroocetnom kiselinom, a uzorci bedrenog mišića postupkom destilacije. Tako pripremljeni uzorci analizirani su enzimskom metodom na uređaju VIVA E (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, USA).

Rezultati: Usporedbom parova vrijednosti koncentracija iz različitih uzoraka pomoću Wilcoxonovog testa utvrđena je statistički značajna razlika između krvi i mišića ($P < 0,001$), dok između očne vodice i krvi te razlike nije bilo ($P = 0,860$). Passing-Bablokova regresijska analiza pokazuje da su koncentracije alkohola izmjerene u očnoj vodici i u krvi podudarne ($Y = 0,160 + 0,953x$), dok između parova vrijednosti iz uzoraka krvi i mišića postoji konstantna, ali ne i proporcionalna razlika ($Y = -0,137 + 0,951x$).

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja pokazali su dobru korelaciju između nalaza koncentracija etanola iz očne vodice i krvi, dok nalazi dobiveni analizom bedrenog mišića nisu bili sukladni nalazima krvi. Pri interpretaciji nalaza svih bioloških uzoraka u svrhu toksikološkog vještačenja uvijek je potrebno pristupiti uz krajnji oprez uzevši u obzir vrstu uzorka, primijenjenu metodu i potencijalne izvore pogrešaka.

Ključne riječi: enzimska metoda, etanol, postmortalni uzorci

9. SUMMARY

ANALYSIS OF ALCOHOL IN POST-MORTEM SAMPLES

Introduction: Samples used for post-mortem alcohol analysis are femoral vein blood samples and urine. Recently, the Croatian law mandates simultaneous sampling of aqueous humour as well. Exceptionally, when it is not possible to collect samples mentioned above, the alcohol concentration can be determined from the femoral muscle distillate by formula calculation which reflects blood ethanol concentration.

Objective: The aim of this study is to determine whether the ethanol concentration in the femoral muscle distillate can be used to estimate blood alcohol concentration.

Study Design: Cross-sectional study.

Methods and materials: 16 femoral vein blood, aqueous humour and femoral muscle samples were collected during the autopsy at the Clinical Institute for Pathology and Forensic Medicine of the Clinical Hospital Centre in Osijek and were used for the analysis. Samples were prepared by deproteinization with trichloroacetic acid; femoral muscle samples were prepared by distillation and enzyme assay method on a VIVA E analyser (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, USA).

Results: Paired difference testing of concentration values from different samples using the Wilcoxon test revealed a statistically significant difference between blood and muscle ($P < 0.001$) samples, whereas the difference between aqueous humour and blood samples was not present ($P = 0.860$). The Passing-Bablok regression analysis indicates that the alcohol concentrations measured in the aqueous humour and in the blood are consistent ($Y = 0.160 + 0.953x$). Paired values of the blood and muscle samples findings indicate a constant but not proportional difference ($Y = -0.137 + 0.951x$).

Conclusion: The results of this study indicate a correlation between the ethanol concentrations levels obtained from aqueous humour and blood analysis, while the ethanol concentrations obtained from the femoral muscle analysis are inconsistent with the blood alcohol concentrations. When interpreting the findings obtained from all biological samples, one must always approach the toxicological evaluation with extreme caution, taking into account the sample choice, methods used and the potential sources of analytical errors.

Key words: enzyme assay, ethanol, post-mortem samples

10. LITERATURA

1. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=702, dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>, datum pristupa: 15.03.2019.
2. Fenton JJ. Toxicology: A Case-Oriented Approach. Boca Raton. CRC Press.2002
3. Josipa Periša, Marko Tijardović. Određivanje niskih koncentracija etanola (< 0,5 g/L) u slini, serumu i urinu nakon konzumacije alkoholnih pića (istraživački rad). Farmaceutsko - biokemijski fakultet. Zagreb. 2016.
4. Stages of acute alcoholic influence/intoxication, Kurt M. Dubowski, 2006., dostupno na: <http://www.drugdetection.net/PDF%20documents/Dubowski%20-%20stages%20of%20alcohol%20effects.pdf>, datum pristupa 16.03.2019.
5. Zakon o sigurnosti prometa na cestama 2008, Narodne novine, br. 67/08.
6. Zakon o sigurnosti prometa na cestama 2015, Narodne novine, br. 64/15.
7. Zakon o zaštiti na radu 2014, Narodne novine, broj 71/14.
8. Zorc B, Grga D. Alkohol. Farm. Glasilo 55. Zagreb. 1999.
9. Cowan DM et al. Best-practices approach to determination of blood alcohol concentration (BAC) at specific time points: Combination of ante-mortem alcohol pharmacokinetic modeling and post-mortem alcohol generation and transport considerations. Regulatory Toxicology and Pharmacology 78. 2016. 24 – 36
10. Katzung BG, Masters SB, Anthony J. Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izdanje. Zagreb. Medicinska naklada. 2011
11. Kent W. The Pharmacokinetics of Alcohol in Healthy Adults. WebmedCentralPHARMACOLOGY. 2012;3(5):WMC003291
12. Jones AW. Pharmacokinetics of Ethanol. Forensic Science Review. 2011; 91 – 136
13. Rusyn I, Bataller R. Alcohol and toxicity. J Hepatol. 2013; 59(2): 387 – 388
14. Jones AW. Evidence based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. Forensic Science International 200. 2010. 1 – 20
15. Vezzoli S, Bernini M, De Ferrari F. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. Ann Ist Super Sanità. 2015, 51;1:19-27
16. Hanzlick RL. Postmortem Ethanol Concentrations and Postmortem Ethanol Production. Acad Forensic Pathol. 2014; 4 (2); 156-160

17. Mohd Hilmi S, Lai PS, Khoo LS et al. Relationship of Blood and Urine Alcohol Levels in Postmortem Samples and Prevalence of Alcohol Level above Legal Limit in Hospital Kuala Lumpur. *SM J Forensic Res Criminol.* 2017; 1(3): 1012
18. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material.* 4. izd. London. Pharmaceutical Press. 2011
19. Antonides H, Marinetti L. Ethanol Production in a Postmortem Urine Sample. *Journal of Analytical Toxicology.* 2011; 35:516-518
20. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicol* (2016) 34:12–40
21. Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhães T. Guidelines for Collection of Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis. *Forensic Sciences Research,* 2016;1:1,42-51
22. Miljen M. *Sudskomedicinski aspekti promene koncentracije etanola u biološkim uzorcima čuvanim u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (doktorska disertacija).* Novi sad. 2016.
23. Štraus B, Stavljenić Rukavina A, Plavšić F et al. *Analitičke tehnike u kliničkom Laboratoriju.* Zagreb. Medicinska naklada. 1997.
24. Sutlović D et al. *Osnove forenzične toksikologije.* Split. Redak. 2011
25. Pravilnik o uvjetima i načinu uzimanja krvi i urina od okrivljenika i drugih osoba te o uvjetima koje ovlaštene ustanove i tijela moraju ispunjavati da bi mogle obavljati poslove analize krvi i urina 2014, NN 86/2014
26. S. Menshawi, LM. Al-Alousi. Detection of Alcohol in Different Post-Mortem Samples. 2007. (dostupno na: https://pdfs.semanticscholar.org/e06c/13223906bfb2c2ffa3e3696889e29f20f47f.pdf?_ga=2.170298404.582445398.1564945527-1579272697.1564945527)
27. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of literature. *Forensic Science International,* 2007;165,10-29
28. Boswell HA, Dorman FL. Uncertainty of Blood Alcohol Concentration (BAC) Results as Related to Instrumental Conditions: Optimization and Robustness of BAC Analysis Headspace Parameters. *Chromatography.* 2015; 2, 691-708

29. Chun HJ, Poklis JL, Poklis A, Wolf CE. Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40:653–658
30. Arys KM, Van Bocxlaer JF, Lambert W, Van Peteghem C, De Leenheer A. Comparison of an enzymatic alcohol dehydrogenase assay and alcohol headspace GC-FID method using statistical analysis on real forensic blood and urine samples. *Problems of Forensic Sciences*. 2000; 43;18–23
31. Gharapetian A, Holmes DT, Urquhart N, Rosenberg F. Dehydrogenase Interference with Enzymatic Ethanol Assays:Forgotten but Not Gone. *Clinical Chemistry*. 2008;54:7, 1251-1252
32. Powers RH, Dean DE. Evaluation of Potential Lactate/Lactate Dehydrogenase Interference with an Enzymatic Alcohol Analysis. *Journal of Analytical Toxicology*. 2009. 33;561-563
33. Nine JS, Moraca M, Virji MA, Rao KN. Serum-Ethanol Determination: Comparison of Lactate and Lactate Dehydrogenase Interference in Three Enzymatic Assays. *Journal of Analytical Toxicology*. 1995. 19;192-196
34. Thompson WC, Malhotra D, Schammel DP, Blackwell W, Ward ME, Dasgupta A. False-Positive Ethanol in Clinical and Postmortem Sera by Enzymatic Assay: Elimination of interference by Measuring Alcohol In Protein-Free Ultrafiltrate. 1994. *Clinical Chemistry* 40(8):1594-5

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Adriana Gustovarac

Datum i mjesto rođenja: 4. travnja 1995., Supetar

Adresa i mjesto stanovanja: Put sv. Josipa 115, 21405 Milna (Brač)

Adresa e-pošte: adriana.gustovarac@gmail.com

Obrazovanje:

2009. – 2013. Prirodoslovna tehnička škola Split

2013. – 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija; preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Sveučilište u Splitu

2016. – 2019. Medicinski fakultet; diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku