

Αρ. Εισ.:.....702.....2005.



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΒΟΥΓΙΟΥΚΛΑΚΗΣ**

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ
ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ
ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

**ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ ΖΙΑΒΡΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

N.5343/32. άρθρο 202, παράγραφος 2



Ημερομηνία αιτήσεως: 15-10-2001

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 467α/ 02-04-2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θεόδωρος Βουγιουκλάκης (Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος (Μέλος)

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Στεφάνου Δημήτριος (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 08-04-2002

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 29-06-2005

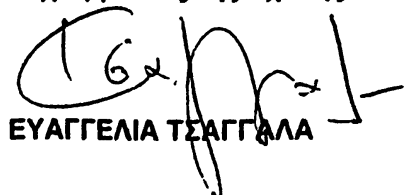
Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Τσιάνος Επαμεινώνδας, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αγνάντη Νίκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
- Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος
- Σκεύας Αντώνιος, Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, μέλος
- Βουγιουκλάκης Θεόδωρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας, επιβλέπων
- Στεφάνου Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
- Μπαϊρακτάρη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, μέλος
- Φριλίγγος Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Η Διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με Βαθμό: «ΑΡΙΣΤΑ»

Η γραμματέας της Σχολής


ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



Στη μνήμη του πατέρα μου
Σωτήρη



Η παρούσα συλλογή αποτελεί μια προσπάθεια να παρουσιαστούν στον αναγνώστη ορισμένα από τα καλύτερα έργα της ελληνικής λογοτεχνίας. Η επιλογή των κειμένων έγινε με βάση την αξία τους και την σημασία τους στην ιστορία της λογοτεχνίας. Η σειρά αυτή είναι η πρώτη σε μια σειρά που θα ακολουθήσει με τον ίδιο τίτλο.

Στη μητέρα μου Άννα

Η Άννα ήταν η μητέρα μου. Ήταν μια γυναίκα που αγαπούσε πολύ τον κόσμο και ήθελε να είναι ευτυχισμένη. Ήταν μια γυναίκα που πίστευε στην δύναμη της αγάπης και ήθελε να την μοιραστεί με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους.

Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους.

Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους.

Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους. Ήταν μια γυναίκα που ήθελε να είναι ευτυχισμένη και να είναι ευτυχισμένη με όλους.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αιθανόλη είναι μια πτητική χημική ένωση, μέλος της ομόλογης σειράς των αλκοολών. Εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών, αφού αποτελεί το βασικό τους συστατικό. Είναι όμως δυνατόν, να παραχθεί μεταθανάτια από τη δράση των μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη (αλκοολική ζύμωση). Επίσης είναι δυνατόν να παραχθεί στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία. Ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης -είτε κατάποση "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή- και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου αποτελεί πρόβλημα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία δεδομένου ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετράται εργαστηριακά στα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα κλπ) χρησιμοποιείται σαν αποδεικτικό στοιχείο σε ποινικά και αστικά δικαστήρια.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται, για πρώτη φορά, ποσοτικός προσδιορισμός των βασικότερων πτητικών ουσιών (ακεταλδεϋδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη και ακετόνη) που ανιχνεύονται στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά και γίνεται προσδιορισμός της προέλευσης της αιθανόλης στο αίμα, με ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, με βάση τις συγκεντρώσεις των παραπάνω πτητικών ουσιών που παράγονται με τη μικροβιακή δραστηριότητα κατά τη σήψη των πτωμάτων. Επίσης, για πρώτη φορά γίνεται εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα, τη στιγμή του θανάτου, που στηρίζεται στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης που παράγονται κατά τη σήψη.

Επιβλέπων της διατριβής ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής της Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Θεόδωρος Βουγιουκλάκης, τον οποίο ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω μια από τις μεγαλύτερες επιθυμίες μου, την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο χώρο της Δικαστικής Τοξικολογίας, για την καθοδήγηση, το αμείωτο ενδιαφέρον σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, την υποστήριξη και τις συμβουλές του, αλλά και για την παρασχεθείσα ευχέρεια των εργαστηριακών μέσων και την εξασφάλιση πλούσιου νεκροτομικού υλικού.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη και στον Αναπληρωτή



Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας κ. Δημήτριο Στεφάνου, για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην “αρχιτέκτονα” της παρούσας διατριβής, Δρ. Βασιλική Α. Μπούμπα, για την καθοδήγησή της και την ανεκτίμητη και πολύπλευρη επιστημονική της συνεισφορά στην υλοποίηση τόσο του πειραματικού μέρους, όσο και του συγγραφικού μέρους της διατριβής. Στάθηκε δασκάλα και φίλη και η αμέριστη συμπαράστασή της αλλά και το προσωπικό της ενδιαφέρον ήταν πολύτιμα για μένα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Αντιγόνη Μητσέλου, για την βοήθειά της στην εξασφάλιση μέρους του βιολογικού υλικού και για τις πολύτιμες συμβουλές της σε επιστημονικό αλλά και προσωπικό επίπεδο.

Εκφράζω επίσης, τις ευχαριστίες μου προς τους συνεργάτες μου, του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, για την πολύπλευρη συνεισφορά τους στη ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω στην Ιατροδικαστή Δρ. Ρουμπίνη Λεονταρή, προϊσταμένη της Ιατροδικαστικής Υπηρεσίας Λάρισας, που με ώθησε στο να ξεκινήσω διατριβή στο χώρο της Δικαστικής Τοξικολογίας, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου, που με την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση συνέβαλε κατ’ εξοχήν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου και των μέχρι τώρα σπουδών μου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
ΣΧΗΜΑΤΑ	vii
ΠΙΝΑΚΕΣ	ix
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	xi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Μεταβολισμός της αιθανόλης	3
1.2. Ενδογενής αλκοολογένεση	5
1.3. Μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης	6
1.4. Μηχανισμός παραγωγής αιθανόλης μεταθανάτια	11
1.5. Κατανομή αιθανόλης στα βιολογικά υλικά	16
1.6. Μέθοδοι μέτρησης αιθανόλης	22
1.6.1. Χημικές μέθοδοι	22
1.6.2. Ενζυμική μέθοδος	22
1.6.3. Αέρια χρωματογραφία	23
1.6.4. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας	25
1.7. Σκοπός της μελέτης	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1. Υλικά	27
α. Γενικά	27
β. Διαλύματα	29
2.2. Νεκροτομικό Υλικό	29
2.3. Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία	30
2.4. Ποιοτική ανίχνευση πτητικών ουσιών	30
2.5. Ποσοτική ανάλυση αιθανόλης	31
2.6. Ποσοτική ανάλυση ακεταλδεϋδης, 1-προπανόλης, 2-προπανόλης και ακετόνης	35
2.7. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση	

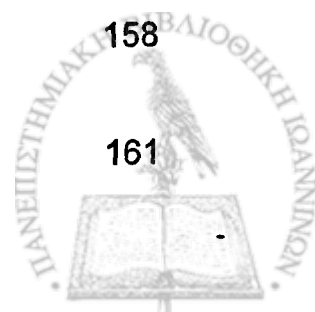


των πτητικών ουσιών	39
2.8. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών	41
2.9. Μελέτη της επίδρασης του υπερκείμενου αέρα των περιεκτών αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών	43
2.10. Μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά τον ενοφθαλμισμό του με αίμα πτώματος	44
2.10.1 Έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης αίματος πτώματος	44
α. Περιστατικό 1	44
β. Περιστατικό 2	44
2.10.2 Ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος	44
α. Περιστατικό 1	44
β. Περιστατικό 2	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1. Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία	47
3.2. Προσδιορισμός πτητικών στα βιολογικά υλικά	48
3.2.1. Προσδιορισμός πτητικών στο αίμα	49
α. Προσδιορισμός των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών	49
β. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα	

επίπεδα της ακεταλδεϋδης	58
γ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 2-προπανόλης	60
δ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της ακετόνης	60
ε. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 1-προπανόλης	63
στ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ακεταλδεϋδης και της 2-προπανόλης με τις σηπτικές εξεργασίες	67
3.2.2. Προσδιορισμός πτητικών σε άλλα βιολογικά υλικά	71
3.3. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών των βιολογικών υλικών	84
3.3.1. Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά κατά την επώαση στους 4°C	85
α. Αίμα	85
β. Ούρα	88
3.3.2. Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	90
α. Αίμα	90
β. Ούρα	94
3.4. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης	



στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών	97
3.4.1. Ιχνηθέτηση με αιθανόλη	97
3.4.2. Ιχνηθέτηση με ακεταλδεύδη	102
3.4.3. Ιχνηθέτηση με μίγμα αιθανόλης-ακεταλδεύδης	105
3.5. Μελέτη της επίδρασης του υπερκείμενου αέρα των περιεκτών αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών	110
3.6. Μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά τον ενοφθαλμισμό του με αίμα πτώματος	114
3.6.1. Έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης	114
α. Περιστατικό 1	114
β. Περιστατικό 2	116
3.6.2. Ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος	118
α. Περιστατικό 1	118
β. Περιστατικό 2	122
3.6.3 Ποσοτική συσχέτιση της παραγόμενης αιθανόλης και 1-προπανόλης	127
α. Περιστατικό 1	127
β. Περιστατικό 2	130
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	153
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	155
SUMMARY	158
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	161



ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1:	Χρωματογραφογραφικός προσδιορισμός προτύπου μίγματος πτητικών ουσιών	32
Σχήμα 2:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της αιθανόλης στο αίμα	33
Σχήμα 3:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της αιθανόλης στα ούρα	34
Σχήμα 4:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της ακεταλδεϋδης	36
Σχήμα 5:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της 1-προπανόλης	37
Σχήμα 6:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της 2-προπανόλης	38
Σχήμα 7:	Πρότυπη καμπύλη μέτρησης της ακετόνης	40
Σχήμα 8:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της ακεταλδεϋδης στα δείγματα αίματος	59
Σχήμα 9:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 2-προπανόλης στα δείγματα αίματος	61
Σχήμα 10:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της ακετόνης στα δείγματα αίματος	62
Σχήμα 11:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 1-προπανόλης στα δείγματα αίματος	64
Σχήμα 12:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης, 20,0 mg/dL-100 mg/dL, με τα επίπεδα της 1-προπανόλης στα δείγματα αίματος	66
Σχήμα 13:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης, 10,0 mg/dL-50,0 mg/dL, με τα επίπεδα των άλλων πτητικών ουσιών στα δείγματα αίματος	69
Σχήμα 14:	Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης, 50,0 mg/dL-300 mg/dL, με τα επίπεδα των άλλων πτητικών ουσιών στα δείγματα αίματος	70



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1:	Λόγοι συγκέντρωσης αιθανόλης στα βιολογικά υλικά προς συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα	21
Πίνακας 2:	Ποιοτική ανίχνευση πτητικών ουσιών στο αίμα	50
Πίνακας 3:	Επίπεδα αιθανόλης στα δείγματα αίματος	51
Πίνακας 4:	Επίπεδα ακεταλδεϋδης στα δείγματα αίματος	53
Πίνακας 5:	Επίπεδα 1-προπανόλης στα δείγματα αίματος	54
Πίνακας 6:	Επίπεδα 2-προπανόλης στα δείγματα αίματος	56
Πίνακας 7:	Επίπεδα ακετόνης στα δείγματα αίματος	57
Πίνακας 8:	Ποιοτική ανίχνευση πτητικών ουσιών στα ούρα	73
Πίνακας 9:	Επίπεδα αιθανόλης στα δείγματα ούρων	74
Πίνακας 10:	Επίπεδα 1-προπανόλης στα δείγματα ούρων	76
Πίνακας 11:	Σύγκριση επιπέδων αιθανόλης σε δείγματα αίματος και ούρων των ίδιων περιστατικών	77
Πίνακας 12:	Σύγκριση επιπέδων 1-προπανόλης σε δείγματα αίματος και ούρων των ίδιων περιστατικών	79
Πίνακας 13:	Σύγκριση επιπέδων αιθανόλης και 1-προπανόλης σε διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου περιστατικού	80
Πίνακας 14:	Ποιοτική ανίχνευση πτητικών ουσιών στα βιολογικά υλικά (εκτός αίματος και ούρων)	82
Πίνακας 15:	Μεταβολή συγκεντρώσεων πτητικών ουσιών κατά την επώαση αίματος στους 4°C	86
Πίνακας 16:	Μεταβολή συγκεντρώσεων πτητικών ουσιών κατά την επώαση ούρων στους 4°C	89
Πίνακας 17:	Μεταβολή συγκεντρώσεων πτητικών ουσιών κατά την επώαση αίματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	92
Πίνακας 18:	Μεταβολή συγκεντρώσεων πτητικών ουσιών κατά την επώαση ούρων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	96
Πίνακας 19:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά την ιχνηθέτηση με αιθανόλη και επώαση στους 4°C	98
Πίνακας 20:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά την ιχνηθέτηση με αιθανόλη	

	και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	100
Πίνακας 21:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεΐδης αίματος εθελοντή αιμοδότη κατά την ιχνηθέτηση με ακεταλδεΐδη και επώαση στους 4°C	103
Πίνακας 22:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεΐδης αίματος εθελοντή αιμοδότη κατά την ιχνηθέτηση με ακεταλδεΐδη και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	104
Πίνακας 23:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεΐδης αίματος εθελοντή αιμοδότη κατά την χνηθέτηση με αιθανόλη και ακεταλδεΐδη και επώαση στους 4°C	106
Πίνακας 24:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεΐδης αίματος εθελοντή αιμοδότη κατά την ιχνηθέτηση με αιθανόλη και ακεταλδεΐδη και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	107
Πίνακας 25:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης κατά την επώαση αίματος του Περιστατικού 1	115
Πίνακας 26:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης κατά την επώαση αίματος του Περιστατικού 2	117
Πίνακας 27:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης κατά τον ενοφθαλμισμό με αίμα του Περιστατικού 1	119
Πίνακας 28:	Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης κατά τον ενοφθαλμισμό με αίμα του Περιστατικού 1	121
Πίνακας 29:	Συγκεντρώσεις αιθανόλης κατά τον ενοφθαλμισμό με αίμα του Περιστατικού 2	124
Πίνακας 30:	Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης κατά τον ενοφθαλμισμό με αίμα του Περιστατικού 2	125
Πίνακας 31:	Παράμετροι που αφορούν στην ποσοτική συσχέτιση αιθανόλης και 1-προπανόλης για το Περιστατικό 1	129
Πίνακας 32:	Παράμετροι που αφορούν στην ποσοτική συσχέτιση αιθανόλης και 1-προπανόλης για το Περιστατικό 2	131



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

5HIAA:	5-υδροξυινδολ-οξικό οξύ
5HTOL:	5-υδροξυ-τριπτοφόλη
ADH:	Αλκοολική αφυδρογονάση
ALDH:	Αλδεϋδική αφυδρογονάση
C ₁ προπ:	Συγκέντρωση 1-προπανόλης
C ₂ προπ:	Συγκέντρωση 2-προπανόλης
C _{max} :	Μέγιστη συγκέντρωση
C ^o ₁ προπ:	Αρχική συγκέντρωση 1-προπανόλης
CoA:	Συνένζυμο A
C _{αθ} :	Συγκέντρωση αιθανόλης
C _{αθ-αίματος} :	Συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα
C _{αθ-ούρων} :	Συγκέντρωση αιθανόλης στα ούρα
C _{ακεταλ} :	Συγκέντρωση ακεταλδεϋδης
C _{ακετον} :	Συγκέντρωση ακετόνης
C _{ιχν} :	Συγκέντρωση ιχνηθέτησης
C ^{ixv} _{αθ} :	Συγκέντρωση ιχνηθετημένης αιθανόλης
C ^{ixv} _{ακεταλ} :	Συγκέντρωση ιχνηθετημένης ακεταλδεϋδης
C _o :	Αρχική συγκέντρωση
C _t :	Τελική συγκέντρωση
dL:	Δέκατο του λίτρου
EDTA:	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EtG:	Γλυκουρονιδικός αιθυλεστέρας
FAEEs:	Αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων
FAMEs:	Μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων
FID:	Ανιχνευτής ιονισμού φλογός
g:	Γραμμάριο
GC:	Αέρια χρωματογραφία
Hs-GC:	Δειγματοληψία υπερκείμενης φάσης στην αέρια χρωματογραφία
Kpa:	Κιλοπασκάλ
L:	Λίτρο
m/z:	Μάζα/φορτίο
m:	Μέτρα
MEOS:	Οξειδωτικό σύστημα μικροσωμάτων



mg:	Χιλιοστό του γραμμαρίου
min:	Λεπτό
mL:	Χιλιοστό του λίτρου
mm:	Χιλιοστό του μέτρου
mmole:	Χιλιοστό του mole
NAD ⁺ :	Νικοτινάμινο-αδένινο-δυνουκλεοσίδιο
NADH:	Ανηγμένη μορφή NAD
NADPH:	Ανηγμένη μορφή του φωσφορυλιωμένου NAD
P4502E1:	Κυτόχρωμα του P4502E1
PBS:	Φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PEth:	Φωσφατιδυλοαιθανόλη
pH:	Αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης του υδρογόνου
v/v:	Όγκος κατ' όγκο
w/v:	Βάρος κατ' όγκο
ΔC:	Μεταβολή συγκέντρωσης (Τελική τιμή-Αρχική τιμή)
ΔC _{1προπ} :	Μεταβολή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης
ΔC _{2προπ} :	Μεταβολή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης
ΔC _{αιθ} :	Μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης
ΔC _{ακεταλ} :	Μεταβολή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης
Θ.Π.:	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
μL:	Εκατομμυριοστό του λίτρου
μm:	Εκατομμυριοστό του μέτρου
Π.υ.:	Περικάρδιο υγρό
σ.ζ.:	Σημείο ζέσεως
Στ.π:	Στομαχικό περιεχόμενο
Υ.υ:	Υαλοειδές υγρό



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αιθανόλη (C_2H_5OH) είναι μια χημική ένωση, μέλος της ομόλογης σειράς των αλκοολών. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη της πολικής ομάδας -OH, από το μικρό μοριακό βάρος (46) και από τη μεγάλη διαλυτότητά της στο νερό. Πρόκειται για άχρωμο πτητικό υγρό, άοσμο, με σημείο ζέσεως $78^\circ C$ και με ειδικό βάρος 0,8 (Morrison 1983). Η αιθανόλη είναι το βασικότερο συστατικό των αλκοολούχων ποτών και η λήψη της, κατά κανόνα, γίνεται από το στόμα με την κατανάλωσή τους (Μιχαλοδημητράκης 1997).

Η αιθανόλη θεωρείται σήμερα το ευρύτερα, ανά τον κόσμο, διαδεδομένο "ευφοριστικό". Η Ιατροδικαστική Τοξικολογία ασχολείται επισταμένα με τη διερεύνηση της δράσης της αιθανόλης στον οργανισμό αφού συχνά αποτελεί αιτία νόσησης ή βίαιου θανάτου (Κουτσελίνης 2000). Η κατανάλωση αιθανόλης συντελεί καθοριστικά στην πρόκληση ατυχημάτων (τροχαίων, εργατικών κλπ), δρα σαν καταλύτης στην πλειοψηφία των αυτοκτονιών, ενώ η χρόνια κατανάλωσή της έχει σα συνέπεια σημαντικές βλάβες ζωτικών οργάνων (αλκοολισμός) (Knight 2004). Η αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες δηλητηριάσεις (μόνη της ή σε συνέργεια με άλλες τοξικές ουσίες) ή να συντελέσει σημαντικά στην πρόκληση άλλων ειδών αιφνίδιου ή βίαιου θανάτου (υποθερμία, απανθράκωση κλπ) (Teresinski et al. 2002, Knight 2004, Teresinski et al. 2005). Συνεπώς, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον οργανισμό αποτελεί απαραίτητο και χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της δράσης της στην εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών ή/και του θανάτου και συντελεί ουσιαστικά στη διερεύνηση του τρίπτυχου «έγκλημα-αυτοκτονία-τυχαίο γεγονός» που απαιτείται σε κάθε βίαιο θάνατο (Κουτσελίνης 2000).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε διάφορα βιολογικά υλικά αποτελεί την πιο συχνή ανάλυση που διενεργείται στα διαπιστευμένα εργαστήρια Τοξικολογίας και η αξιολόγηση των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων αποτελεί πολύ συχνά μέρος ευρύτερης δικαστικής έρευνας (Sturner et al. 2000). Η αξιολόγηση οποιασδήποτε καταστάσεως, ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης αιθανόλης, και ο καταλογισμός οιασδήποτε πιθανής ποινικής ευθύνης, προϋποθέτει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης



της αιθανόλης στο αίμα τη δεδομένη στιγμή που ενδιαφέρει. Η «ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα, πάνω από την οποία είναι δυνατή η προσμέτρηση και ο καταλογισμός ευθύνης έχει προσδιοριστεί σε διαφορετικά επίπεδα για κάθε κράτος. Τα περισσότερα κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, έχουν καθιερώσει ως «ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης ($C_{αιθ}$) στο αίμα τα 50,0 mg/dL (Κουτσελίνης 2000).

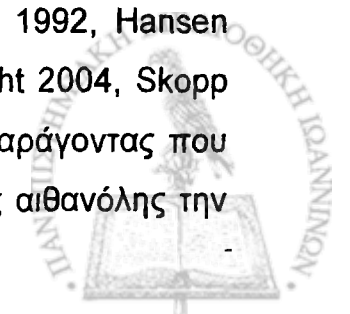
Η αξιολόγηση της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης της αιθανόλης στα διάφορα βιολογικά υλικά, που λαμβάνονται κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, αποτελεί εξαιρετικά δυσχερή διαδικασία που περιπλέκεται από πολλούς παράγοντες. Σε περιπτώσεις που τα βιολογικά υλικά προέρχονται από πτώματα με προηγμένες σηπτικές εξεργασίες η εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στο αίμα τη στιγμή του θανάτου είναι σχεδόν αδύνατη.

Η παρουσία της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια, μπορεί να οφείλεται σε τρεις διαφορετικού λόγους:

- (α) κατάποση αιθανόλης από το άτομο "εν ζωή" κατά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών,
- (β) ενδογενής "αλκοολογένεση" σε άτομα "εν ζωή", πιθανόν εξαιτίας μικροβιακών ζυμώσεων που λαμβάνουν χώρα στο έντερο και
- (γ) μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης είτε στο πτώμα από τους μικροοργανισμούς που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη είτε στα βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία.

Οι παράγοντες που μπορεί να περιπλέξουν περαιτέρω την αξιολόγηση των τοξικολογικών αναλύσεων είναι το είδος των διαθέσιμων βιολογικών υλικών που συλλέγονται για ανάλυση, η ακεραιότητα (ποιότητα) των δειγμάτων αλλά και οι συνθήκες αποθήκευσής τους.

Η μεταθανάτια παραγωγή της αιθανόλης, εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης που δεν είναι δυνατόν να προβλεφθούν, με αποτέλεσμα να εξάγονται λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την συγκέντρωσή της στον οργανισμό την στιγμή του θανάτου (Zumwalt et al. 1982, Briglia et al. 1992, Hansen 1994, Grellner et al. 1997, Videira de Lima et al. 1999, Knight 2004, Skopp 2004). Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι είναι ο βασικότερος παράγοντας που μπορεί να δυσχεράνει την αξιολόγηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης την



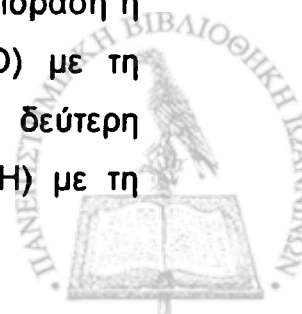
στιγμή του θανάτου, με σοβαρές νομικές και ιατρικές συνέπειες τόσο στη διευκρίνιση της αιτίας θανάτου, όσο και στην απονομή ποινικών ευθυνών. Ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης στο πτώμα -κατάποση "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή- και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου αποτελεί πρόβλημα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία δεδομένου ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετράται εργαστηριακά στα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα κλπ) χρησιμοποιείται σαν αποδεικτικό στοιχείο σε ποινικά και αστικά δικαστήρια (Briglia et al. 1992, Grellner et al. 1997, Videira de Lima et al. 1999, Gouille et al. 2003, Norberg et al. 2003, Knight 2004, Skopp 2004).

1.1 Μεταβολισμός της αιθανόλης.

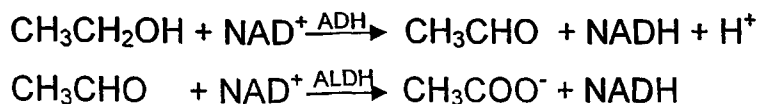
Μετά την κατάποση αιθανόλης γίνεται απορρόφησή της, με παθητική διάχυση, από τις βλεννογόνους μεμβράνες του γαστρεντερικού σωλήνα (κυρίως από το έντερο) (Wilkinson et al. 1977, Holford 1987). Την απορρόφηση ακολουθεί ταχύτατη κατανομή στον οργανισμό, στους ιστούς του οποίου προσηλώνεται ανάλογα με την υδατοπλήθειά τους (Marshall et al. 1983, Holford 1987). Ιστοί πλούσιοι σε νερό, όπως είναι το αίμα, συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό της καταναλωθείσας αιθανόλης. Η απορρόφησή της ολοκληρώνεται συνήθως σε 45' με 3 ώρες μετά την κατάποση.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της καταναλωθείσας αιθανόλης (~95-98%) μεταφέρεται μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας στο ήπαρ όπου μεταβολίζεται με ενζυματική οξείδωση (Ramchandani et al. 2001). Μικρό ποσοστό της αιθανόλης απομακρύνεται αμετάβλητο με τον εκπνεόμενο αέρα (0,7%), τα ούρα (0,3%), τον ιδρώτα (0,1%), τα κόπρανα, το γάλα και τα σίελα (Holford 1987).

Η κύρια οξειδωτική πορεία μεταβολισμού της αιθανόλης στο ήπαρ πραγματοποιείται μέσω δύο αντιδράσεων (VonWartburg et al. 1964, Li et al. 1969, Edenberg et al. 1997, Caballeria 2003). Κατά την πρώτη αντίδραση η αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) οξειδώνεται προς ακεταλδεΐδη (CH_3CHO) με τη δράση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH). Κατά τη δεύτερη αντίδραση η ακεταλδεΐδη οξειδώνεται προς οξικό οξύ (CH_3COOH) με τη



δράση του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH) (Crabb et al. 2004). Και οι δύο αντιδράσεις γίνονται με τη συμμετοχή του συνενζύμου νικοτινάμινο-αδένινο-δυνουκλεοτίδιο (NAD^+):



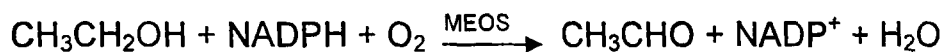
Η αλκοολική αφυδρογονάση κορέννεται όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα είναι μεγαλύτερη από 16,0 mg/dL και ακόμα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης ο ρυθμός μεταβολισμού συνεχίζει να παραμένει σταθερός.

Τέλος, το οξικό οξύ εισάγεται στον κύκλο του Krebs και μετατρέπεται σε νερό (H_2O) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2):



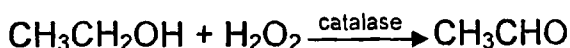
Παράλληλα με την κύρια μεταβολική οδό πραγματοποιούνται και δύο δευτερεύουσες οξειδωτικές πορείες για τη μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεϋδη. Με τις δευτερεύουσες πορείες οξειδώνεται λιγότερο από το 10% της συνολικής ποσότητας της αιθανόλης (χωρίς τη συμμετοχή του ADH) (Cornell et al. 1979).

Η πρώτη οξειδωτική πορεία πραγματοποιείται μέσω του οξειδωτικού συστήματος των μικροσωμάτων (Microsomal Ethanol Oxidizing System, MEOS), που αποτελεί ένα ενζυμικό σύμπλεγμα που οξειδώνει την αιθανόλη σε ακεταλδεϋδη παρουσία NADPH και μοριακού οξυγόνου (Lieber et al. 1970, Asai et al. 1996, Lieber 1999):



Το πιο σημαντικό ένζυμο του MEOS για το μεταβολισμό της αιθανόλης είναι το κυτόχρωμα P4502E1 (CYP2E1). Ο αυξημένος ρυθμός μεταβολισμού της αιθανόλης, σε υψηλές συγκεντρώσεις, που παρατηρείται στους χρόνιους αλκοολικούς οφείλεται στην επαγωγή του κυτοχρώματος CYP2E1 (Ohnishi et al. 1977, Ueno et al. 1996, Caro et al. 2004).

Η δεύτερη οξειδωτική πορεία πραγματοποιείται με τη δράση του ενζύμου καταλάση. Η καταλάση, παρουσία υπεροξειδίων, οξειδώνει την αιθανόλη προς ακεταλδεϋδη (Bradford et al. 1993, Lands 1998):



Η κάθαρση της αιθανόλης από τον οργανισμό ακολουθεί κινητική μεταξύ μηδενικής και πρώτης τάξης (Mullen 1977, Jones 2000). Για μέτριες και υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, 20,0-300 mg/dL, η κάθαρση ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης, ενώ για συγκεντρώσεις μικρότερες των 20,0 mg/dL η κινητική της κάθαρσης είναι πρώτης τάξης (Garriott 2003). Κινητική πρώτης τάξης παρατηρείται και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (> 300 mg/dL) μέχρι που η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα ελαττωθεί τόσο ώστε να βρεθεί στα επίπεδα όπου ακολουθείται κινητική μηδενικής τάξης (Hammond et al. 1973, Bogusz et al. 1977).

1.2. Ενδογενής αλκοολογένεση.

Ως «ενδογενής αλκοολογένεση» ("auto-brewery" syndrome) χαρακτηρίζεται η παρουσία αιθανόλης στον οργανισμό χωρίς προηγούμενη κατάποσή της και αποδίδεται στις μικροβιακές ζυμώσεις που πραγματοποιούνται στο έντερο (Logan et al. 2000). Η συγκέντρωση της αιθανόλης που έχει προσδιοριστεί στο αίμα υγιών ατόμων ή ατόμων με διάφορες μεταβολικές δυσλειτουργίες (διαβήτη, ηπατίτιδες, κίρρωση) και έχει αποδοθεί σε ενδογενή αλκοολογένεση κυμαίνεται από 0,00-0,08 mg/dL (Logan et al. 2000). Οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται πολύ μικρές ώστε να έχουν κάποια δικαστική ή ιατρική σπουδαιότητα. Έχουν αναφερθεί όμως και περιπτώσεις όπου έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, όπως 80,0 mg/dL, που παρήχθησαν ενδογενώς (Logan et al. 2000). Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν είτε Ασιάτες που παρουσίαζαν γενετικό πολυμορφισμό των ενζύμων που σχετίζονταν με τον μεταβολισμό της αιθανόλης και υπέφεραν από σοβαρές μικροβιακές λοιμώξεις (Kaji et al. 1984) είτε άτομα που υπέστησαν βακτηριακές λοιμώξεις στην κοιλιακή χώρα μετά από επεμβάσεις, όπως η περίδεση της νήστιδας σε περιπτώσεις παθολογικής παχυσαρκίας (Mezey et al. 1975). Τα περιστατικά αυτά έχουν θεωρηθεί μεμονωμένες και ακραίες περιπτώσεις. Συνεπώς, είναι γενικά αποδεκτό ότι στα άτομα "εν ζωή" μόνο η υπερκατανάλωση αλκοολούχων ποτών μπορεί να οδηγήσει σε «ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα και όχι η ενδογενής αλκοολογένεση (Logan et al. 2000).



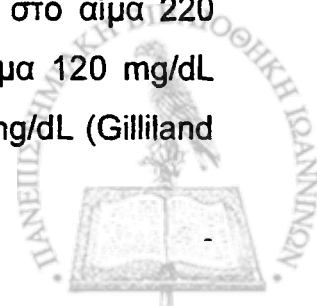
1.3. Μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης.

Η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης είναι δυνατόν να λαμβάνει χώρα τόσο σε πτώματα, όσο και σε βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία. Η πρώτη καταγραφή της μεταθανάτια παραγόμενης αιθανόλης έγινε το 1936 (Nicloux 1936, Wagner 1936) και μεταγενέστερα τεκμηριώθηκε επαρκώς από πολλούς επιστήμονες. Η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης παρατηρήθηκε σε πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης. Τα πτώματα είτε προέρχονταν από περιστατικά αιφνίδιων θανάτων (Corry 1978, Caplan et al. 1990, Videira de Lima et al. 1999) είτε βρέθηκαν σε υπαίθριους χώρους μετά από αεροπορικά δυστυχήματα (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Johnson et al. 2004) είτε ανασύρθηκαν από το νερό (Zumwalt et al. 1982, Gilliland et al. 1993, Hadley et al. 2003, Moriya et al. 2004).

Σε σχετικές μελέτες που αφορούσαν πτώματα τα οποία ανεβρέθηκαν μετά από μερικές ώρες μέχρι και ημέρες από το θάνατο, μετά από αεροπορικά ατυχήματα, καταγράφηκε εκτεταμένη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης, στα δείγματα αίματος, σε ποσοστό 27% (θετικά για αιθανόλη θεωρήθηκαν τα δείγματα με $C_{αιθ} > 40,0$ mg/dL) (Canfield et al. 1993), 57% (θετικά για αιθανόλη θεωρήθηκαν τα δείγματα με $C_{αιθ} > 40,0$ mg/dL) (Kuhlman et al. 1991) και 100% (θετικά για αιθανόλη θεωρήθηκαν τα δείγματα με $C_{αιθ} > 10,0$ mg/dL) (Mayes et al. 1992).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων που η συγκέντρωση της αιθανόλης αποδόθηκε σε μεταθανάτια παραγωγή, οι προσδιοριζόμενες τιμές θεωρήθηκαν πολύ μικρές ως μέτριες ($< 70,0$ mg/dL) (σε σύγκριση πάντα με τα νομικά όρια $50,0$ mg/dL) (O'Neal et al. 1996a). Έχουν υπάρξει βέβαια και περιπτώσεις που έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις μεταθανάτια παραγόμενης αιθανόλης (μετρούμενες με αέρια χρωματογραφία), που κυμαίνονταν από 120 mg/dL ως 220 mg/dL. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν:

(α) πτώματα σε αποσύνθεση: ένα περιστατικό με $C_{αιθ}$ στο αίμα 220 mg/dL (Zumwalt et al. 1982), ένα περιστατικό με $C_{αιθ}$ στο αίμα 120 mg/dL (Caplan et al. 1990) και ένα περιστατικό με $C_{αιθ}$ στο αίμα 160 mg/dL (Gilliland et al. 1993),

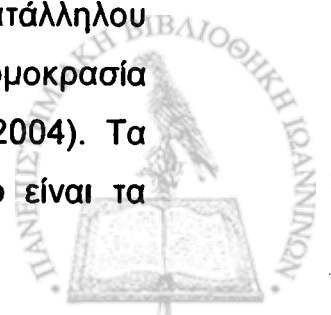


(β) πτώματα που προήλθαν μετά από αεροπορικά ατυχήματα: δύο περιστατικά με $C_{αιθ}$ στο αίμα 180 mg/dL (Canfield et al. 1993) και ένα με $C_{αιθ}$ στο αίμα 190 mg/dL (Mayes et al. 1992) και

(γ) ένα περιστατικό πτώματος που προήλθε μετά από πνιγμό, που η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετρήθηκε στο μεσοθωράκιο υγρό ήταν 170 mg/dL (Nanikawa et al. 1974),

Έχει τέλος, καταγραφεί μια και μοναδική περίπτωση πτώματος με την εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 300 mg/dL, που αποδόθηκε εξολοκλήρου σε μεταθανάτια παραγωγή (Canfield et al. 1993).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε βιολογικά υλικά που ελήφθησαν μεταθανάτια, έδειξαν ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων είναι δυνατόν να μεταβληθεί. Η μεταβολή μπορεί να οφείλεται είτε σε οξείδωση ή/και εξάτμιση της αιθανόλης είτε στη μικροβιακή δραστηριότητα (Chang et al. 1984, Nanikawa et al. 1988, Chang et al. 1989, Sulkowski et al. 1995, Helander et al. 1995, Amick et al. 1997, Garriott 2003). Η σημαντικότερη μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία μπορεί να προκληθεί από τη δράση του μικροβιακού φορτίου του δείγματος και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης μέχρι και 40,0 mg/dL (Corry 1978). Η διατήρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των δειγμάτων θεωρείται εξαιρετικής σπουδαιότητας αφού είναι δυνατόν να ζητηθεί επανεξέταση των δειγμάτων, από την εντολοδότιδα αρχή, μετά από εβδομάδες ή ακόμα και μήνες από τη δειγματοληψία (Skopp 2004). Η αναγκαία διαδικασία που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η σταθερότητα των δειγμάτων που αναλύονται για την παρουσία αιθανόλης, κατά την αποθήκευσή τους, συνίσταται: στη συλλογή των δειγμάτων όσο πιο γρήγορα γίνεται μετά το θάνατο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών στο πτώμα και κατ' επέκταση στα δείγματα, στα σωληνάρια αιμοληψίας θα πρέπει να τοποθετείται τόσο δείγμα ώστε να μην αφήνεται διαθέσιμος χώρος για εξάτμιση, να πραγματοποιείται άμεση προσθήκη του κατάλληλου συντηρητικού στα δείγματα και άμεση αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία κοντά στους 0°C (Sulkowski et al. 1995, Garriott 2003, Skopp 2004). Τα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για το σκοπό αυτό είναι τα

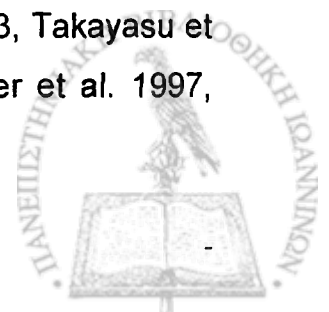


άλατα του φθορίου (Garriott 2003), αν και κάτω από ειδικές συνθήκες αποδείχθηκαν μη επαρκή για τη συντήρηση (Chang et al. 1989, Helander et al. 1995).

Με την μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης έχει συνδεθεί η παράλληλη παρουσία και ανίχνευση και άλλων πτητικών ουσιών στα δείγματα (Nanikawa et al. 1974, Zumwalt et al. 1982, Caplan et al. 1990, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Gilliland et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Hadley et al. 2003, Johnson et al. 2004, Moriya et al. 2004). Οι πτητικές αυτές ουσίες παράγονται μεταθανάτια κυρίως λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας, και η ταυτότητα καθώς και η ποσότητά τους εξαρτάται από το είδος και τον αριθμό των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα πτώματα κατά τα διάφορα στάδια της αποσύνθεσης (Davis et al. 1972, Corry 1978). Η παρουσία πτητικών ουσιών όμως έχει καταγραφεί και σε μεταθανάτια βιολογικά υλικά είτε χρόνια αλκοολικών (Pounder et al. 1998) είτε διαβητικών (Pounder et al. 1998, Smialek et al. 1998) που ο θάνατός τους αποδόθηκε σε αλκοολική κετοοξέωση. Επιπρόσθετα, διάφορες πτητικές ουσίες, σε ποικίλες συγκεντρώσεις, έχουν ανιχνευτεί και στο αίμα ζώντων ατόμων αφενός μετά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών είτε από αλκοολικούς (Haffner et al. 1997a, Zuba et al. 2002) είτε μη αλκοολικούς (Haffner et al. 1997b) και αφετέρου, ως προϊόντα φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών (Logan et al. 1994, Wu et al. 1995, Jones et al. 1995, Haffner et al. 1996, Zuba et al. 1998, Kalapos 2003).

Οι πτητικές ουσίες που ανιχνεύονται πιο συχνά στα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια είναι:

- η μεθανόλη (CH_3OH) (Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Amick et al. 1997),
- η ακεταλδεΐδη (CH_3CHO) (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Amick et al. 1997, Skopp 2004, Lewis et al. 2004),
- η 1-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) (Davis et al. 1972, Nanikawa et al. 1982, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Takayasu et al. 1995a, O'Neal et al. 1996a, Amick et al. 1997, Grellner et al. 1997,



Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004, Skopp 2004, Moriya et al. 2004),

- η 2-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Amick et al. 1997, Grellner et al. 1997, Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004, Skopp 2004),
- η ακετόνη (CH_3COCH_3) (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Amick et al. 1997, Smialek et al. 1998, Lewis et al. 2004),
- το προπανικό οξύ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) (Davis et al. 1972),
- η 1-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, O'Neal et al. 1996a, Grellner et al. 1997, Skopp 2004),
- η ισοβουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$) (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Lewis et al. 2004, Skopp 2004),
- η 2-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{CH}_3$) (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Lewis et al. 2004, Skopp 2004),
- η τριτοταγής βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OHCH}_3$) (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993) και
- η ισοαμυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) (Skopp 2004).

Η 1-προπανόλη έχει θεωρηθεί ως η πτητική ουσία που συσχετίζεται καλύτερα με το φαινόμενο της μικροβιακής παραγωγής της αιθανόλης μεταθανάτια (Nanikawa et al. 1982, Takayasu et al. 1995a, Lewis et al. 2004, Moriya et al. 2004). Διάφορες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης, που κυμαίνονταν μεταξύ 0,001-0,076 mg/g (μέσες τιμές), έχουν ανιχνευτεί ως προϊόν αποσύνθεσης στον εγκέφαλο ατόμων που έχουν καταλήξει από πνιγμό (Moriya et al. 2004). Επίσης η 1-προπανόλη έχει ανιχνευτεί στο αίμα, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL έως 7,00 mg/dL, όπου έχει θεωρηθεί προϊόν σήψης (O'Neal et al. 1996a, b). Επιπρόσθετα, έχει ανιχνευτεί μαζί με την αιθανόλη σε διάφορα βιολογικά υλικά όπως ούρα, γαστρικό περιεχόμενο και ενδοπεριτοναϊκό υγρό, ατόμων που έπασχαν από περιτονίτιδα (Moriya et al. 1994), στοιχείο που υποστηρίζει την παρουσία της ως προϊόν μικροβιακής δραστηριότητας.



Ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης προς τη συγκέντρωση της 1-προπανόλης έχει προσδιοριστεί στο αίμα, από την καρδιακή κοιλότητα, και στο μηριαίο μύ σε επίμυς, και έχει χρησιμοποιηθεί, αφενός για την επιβεβαίωση της ύπαρξης της μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής της αιθανόλης και αφετέρου για την εύρεση πιθανής ποσοτικής σχέσης μεταξύ της αιθανόλης και της 1-προπανόλης στα δείγματα (Nanikawa et al. 1974, Nanikawa et al. 1982). Ο λόγος που έχει προσδιοριστεί έχει αμφισβητηθεί από άλλους ερευνητές, ως προς τη χρησιμότητά του στην εκτίμηση της ποσότητας της μεταθανάτια παραγόμενης αιθανόλης, αφού στις παραπάνω περιπτώσεις δεν αναφέρονται τα εύρη της διακύμανσης του προσδιοριζόμενου λόγου αλλά παρουσιάζονται μόνο οι μέγιστες τιμές (O' Neal et al. 1996a). Από τις μελέτες που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα προκύπτει ότι δεν είναι δυνατή με βεβαιότητα η εκτίμηση και η εύρεση της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στον άνθρωπο τη στιγμή του θανάτου από τα επίπεδα της αιθανόλης και 1-προπανόλης που προσδιορίζονται στα δείγματα μεταθανάτια.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα πτητικά (εκτός της 1-προπανόλης), που ανιχνεύονται στα διάφορα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια, η σχέση της συγκέντρωσής τους με αυτή της αιθανόλης παραμένει αδιευκρίνιστη (Lewis et al. 2004). Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται είτε στον διαφορετικό ρυθμό παραγωγής που μπορεί να έχουν σε κάθε περίπτωση, αφού κάθε πτώμα αποτελεί μοναδικό βιοχημικό σύστημα (Skopp 2004) είτε στο ότι μπορεί να προέρχονται και από άλλες πηγές, εκτός της μικροβιακής δραστηριότητας, όπως για παράδειγμα κατανάλωση αλκοολούχων ποτών (Haffner et al. 1997a, b, Pounder et al. 1998, Zuba et al. 2002) είτε τέλος, μπορεί να παράγονται ως προϊόντα διαφόρων μεταβολικών διεργασιών (Logan et al. 1994, Wu et al. 1995, Jones et al. 1995, Haffner et al. 1996, Pounder et al. 1998, Smialek et al. 1998, Zuba et al. 1998, Καλαpos 2003). Η παρουσία των διαφόρων αυτών πτητικών στα βιολογικά υλικά αποτελεί για αρκετούς επιστήμονες στοιχείο αμφίβολης αξίας αφού η χρησιμοποίησή τους ως δείκτες μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα (Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Johnson et al. 2004).



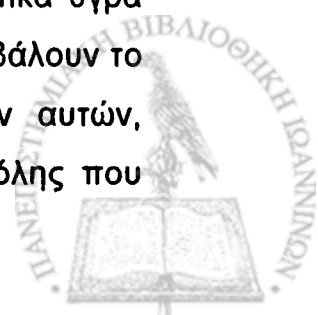
Οι προσπάθειες για την εξεύρεση δεικτών της μεταθανάτιας παραγωγής της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά συνεχίστηκαν με τον προσδιορισμό βιομορίων που θα μπορούσαν να συσχετισθούν με την κατάποση της αιθανόλης "εν ζωή" και όχι με τη μεταθανάτια παραγωγή της. Μετά την κατανάλωση αιθανόλης, ο μεταβολισμός της επηρεάζει το μεταβολισμό της 5-υδροξυτριπταμίνης (5-hydroxytryptamine) (σεροτονίνη) με αποτέλεσμα ο λόγος των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών 5-υδροξυτριπτοφόλη (5HTOL) προς 5-υδροξυινδολ-οξικό οξύ (5HIAA), που εκκρίνονται στα ούρα, να αυξάνεται σημαντικά (Helander et al. 1995). Ο παραπάνω λόγος παραμένει αυξημένος για αρκετές ώρες, ακόμα και όταν η αιθανόλη έχει μεταβολιστεί (προθανάτια ή μεταθανάτια) (Helander et al. 1995).

Άλλοι μεταβολίτες οι οποίοι συντίθενται μέσω του μη οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης και μόνο όταν η αιθανόλη είναι παρούσα στον οργανισμό είναι η φωσφατιδυλοαιθανόλη (PEth) (Hansson et al. 2001), οι αιθυλεστέρες (FAEEs) (Refaai et al. 2002, Best et al. 2003) και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMEs) (Emrich et al. 1997). Ο προσδιορισμός των επιπέδων τους στα βιολογικά υλικά αποτελεί ένδειξη προθανάτιας κατάχρησης αιθανόλης (Emrich et al. 1997, Hansson et al. 2001, Refaai et al. 2002, Best et al. 2003).

Τέλος, ο γλυκουρονιδικός αιθυλεστέρας (EtG) είναι μεταβολίτης της αιθανόλης και ανιχνεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα στα βιολογικά υλικά ακόμα και μετά την πλήρη αποβολή της αιθανόλης (Wurst et al. 2000). Η ανίχνευση των βιομορίων αυτών σε ιστούς μεταθανάτια υποδεικνύει κατάποση αιθανόλης από το άτομο "εν ζωή", αποκλείοντας έτσι έμμεσα την μεταθανάτια παραγωγή.

1.4. Μηχανισμός παραγωγής αιθανόλης μεταθανάτια.

Μετά την κατάληξη των ατόμων οι ενδογενείς μικροοργανισμοί (ιδιαίτερα από την εντερική χώρα) διεισδύουν ταχύτατα στα σωματικά υγρά και στους ιστούς, παράλληλα με τους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν το πτώμα από το περιβάλλον. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών, ενδογενών ή/και εξωγενών, καθορίζει τη συγκέντρωση της αιθανόλης που



μετράται στη συνέχεια στα βιολογικά υλικά (μειώνοντας ή αυξάνοντας την συγκέντρωση της αιθανόλης σε σχέση με τη συγκέντρωσή της τη στιγμή του θανάτου). Η συγκέντρωση της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά μπορεί είτε να μειωθεί μέσω μετατροπής της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη (Smalldon et al. 1973, Chang et al. 1984) είτε να αυξηθεί λόγω μικροβιακών αλκοολικών ζυμώσεων που υφίστανται οι υδρογονάνθρακες (Corry 1978). Η διαλεύκανση του σχετικού μηχανισμού παραγωγής της αιθανόλης μεταθανάτια αποτελεί μέγιστη πρόκληση, αφού είναι ο σημαντικότερος από όλους τους παράγοντες που είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση της αιθανόλης μεταθανάτια, είτε η παραγωγή λαμβάνει χώρα στα πτώματα είτε στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς μετά τη δειγματοληψία τους.

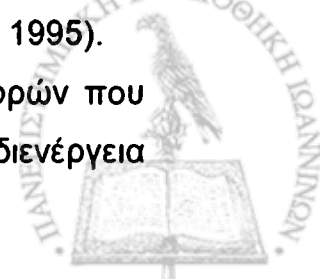
Στην προσπάθεια διευκρίνησης του μηχανισμού παραγωγής της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες. Κοινώς αποδεκτό είναι το γεγονός ότι η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί μεταθανάτια μόνο από τη δράση των μικροοργανισμών (Davis et al. 1972, Corry 1978). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ιστών που ελήφθησαν μεταθανάτια από μυσ, αποδείχθηκε ότι υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης παρήχθησαν, κατά την αποσύνθεση, στους ιστούς πτωμάτων «κοινών» μυών, ενώ δεν παρήχθηκε αιθανόλη στους ιστούς πτωμάτων μυών που είχαν απαλλαγεί από την παρουσία μικροοργανισμών αμέσως μετά το θάνατό τους (Davis et al. 1972). Η συγκέντρωση της αιθανόλης που παρήχθηκε ήταν άμεση συνάρτηση του χρόνου που μεσολάβησε μετά το θάνατο των ζώων και ήταν μεγαλύτερη από 50,0 mg/dL σε όλους τους ιστούς των «κοινών» μυών μετά από πέντε ημέρες επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Davis et al. 1972). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η αιθανόλη που υπήρχε τη στιγμή του θανάτου αποικοδομούνταν ταχύτατα τις δύο πρώτες ημέρες μεταθανάτια, μετά από παραμονή στους 30°C, ενώ το ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε και παραγωγή αιθανόλης (Takayasu et al. 1995a, b). Τέλος, σε άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα αίματος που επιμολύνθηκαν με μικροοργανισμούς και επώαστηκαν για μία ημέρα στους 37°C, καταγράφηκε η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης την πρώτη ημέρα της επώασης και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή μείωση της συγκέντρωσής της. Η μείωση αποδόθηκε στην κατανάλωση και αποικοδόμηση της αιθανόλης προς οξικό οξύ και CO₂ από τους

μικροοργανισμούς, μετά την εξάντληση του άλλου διαθέσιμου θρεπτικού μέσου (Amick et al. 1997).

Σε αίμα που επώαστηκε είτε με σαπρομύκητες (μικτό πληθυσμό βακτηρίων και μυκήτων) και μικτό πληθυσμό μυκήτων (χωρίς να διευκρινίζονται τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν) (Nanikawa et al. 1988), είτε με *Candida Albicans* (Chang et al. 1989) ή *Scacharomyces cerevisiae* (Amick and Habben 1997), παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης η συγκέντρωση της οποίας ήταν συνάρτηση της θερμοκρασίας, του χρόνου, της συγκέντρωσης και του είδους του υποστρώματος, του αριθμού και του είδους των μικροοργανισμών, της ενεργότητας της αλκοολικής αφυδρογονάσης, της συγκέντρωσης του NAD^+ και της παρουσίας ή όχι αντιβιοτικών κατά την επώαση (Nanikawa et al. 1988; Chang et al. 1989, Amick et al. 1997).

Παραγωγή αιθανόλης έχει παρατηρηθεί και στα ούρα που περιείχαν μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης (250-2000 mg/dL) και βρέθηκαν θετικά στις μικροβιολογικές καλλιέργειες για την παρουσία μυκήτων, μετά από επώασή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Saady et al. 1993). Η παραγόμενη αιθανόλη ήταν ανιχνεύσιμη μετά από 12 ώρες επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η ποσότητά της ήταν συνάρτηση του χρόνου της επώασης (Saady et al. 1993). Κατά την επιμόλυνση ούρων με στελέχη της *Candida Albicans* και επώαση στους 22°C, παρουσία επαρκούς ποσότητας γλυκόζης παρήχθηκε αιθανόλη μετά από επτά ημέρες επώασης, σε υψηλή συγκέντρωση της τάξεως των 788 mg/dL (Helander et al. 1995). Παραγωγή αιθανόλης έχει επίσης παρατηρηθεί *in vitro* στα ούρα μετά από επώασή τους με παθογόνους μικροοργανισμούς του ουροποιητικού συστήματος όπως μύκητες (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* και άλλα στελέχη *Candida*) και βακτήρια (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* και *Proteus Mirabilis*) (Sulkowski et al. 1995). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι μύκητες *Candida albicans* παρήγαγαν την μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης (~52,0 mg/dL) σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, η γλυκόζη αποτέλεσε το καλύτερο υπόστρωμα, όσον αφορά την απόδοση σε αιθανόλη, σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα που ελέγχθηκαν κατά τη μελέτη (Sulkowski et al. 1995).

Σε μελέτη βιολογικών ιστών και συγκεκριμένα μυών και νεφρών που ελήφθησαν από θύματα αεροπορικών ατυχημάτων, κατά τη διενέργεια



νεκροψίας-νεκροτομής, επίσης καταγράφηκε παραγωγή αιθανόλης κατά την επώασή τους στους 4°C και στους 25°C. Η επιλογή των βιολογικών ιστών έγινε με κριτήριο την υποψία ύπαρξης μικροβιακού φορτίου, με βάση τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης ή την υψηλή συγκέντρωση άλλων πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν στους διάφορους ιστούς των αντίστοιχων περιστατικών. Η παραγωγή αιθανόλης στους βιολογικούς ιστούς ήταν συνάρτηση του χρόνου, της θερμοκρασίας και της παρουσίας συντηρητικών (Lewis et al. 2004).

Από τα προηγούμενα, γίνεται σαφές ότι η μεταθανάτια παραγωγή της αιθανόλης μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως το πλήθος και το είδος των μικροοργανισμών, το είδος και την ποσότητα του διαθέσιμου υποστρώματος, τη θερμοκρασία και το χρόνο, την υγρασία, τη διαθεσιμότητα αέρα (οξυγόνου), το pH των βιολογικών υλικών και την παρουσία συντηρητικού (O'Neal et al. 1996a).

Οι μικροοργανισμοί που θεωρούνται ως οι πιο σημαντικοί αποικιστές των πτωμάτων, και παράλληλα, οι πιο σημαντικοί παραγωγοί αιθανόλης είναι οι: *Clostridium perfringens* και άλλα *Clostridium spp.*, διάφορα εντεροβακτήρια (κυρίως *E.coli* και *Proteus spp.*), διάφοροι μικρόκοκκοι (κυρίως *Staphylococcus aureus*), στρεπτόκοκκοι και διάφορα είδη βακίλων (Corry 1978). Την πιο σημαντική αύξηση στα επίπεδα της αιθανόλης στα πτώματα θεωρείται ότι την προκαλούν οι εντερόκοκκοι και οι εντερικοί βάκιλοι (Corry 1978, Vu et al. 2000). Σε πτώματα σε αποσύνθεση έχουν επίσης βρεθεί και μύκητες ικανοί να παράγουν αιθανόλη αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Από τους βασικότερους είναι η *Candida albicans*, άλλα στελέχη της *Candida*, ο *Saccharomyces cerevisiae* και άλλα στελέχη του *Saccharomyces* (Corry 1978).

Όλοι οι μικροοργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αιθανόλη διαθέτουν το ένζυμο ADH (Corry 1978, Salaspuo 1997). Η παραγωγή αιθανόλης από ζύμες και μύκητες πραγματοποιείται με ζύμωση της γλυκόζης μέσω της πορείας Embden-Meyerhof-Parnay. Τα βακτήρια παράγουν αιθανόλη σε αναερόβιες συνθήκες μέσω της ετερογαλακτικής ζύμωσης (Gottschalk 1986). Οι συνολικές αντιδράσεις για τις παραπάνω πορείες περιγράφονται ως εξής:



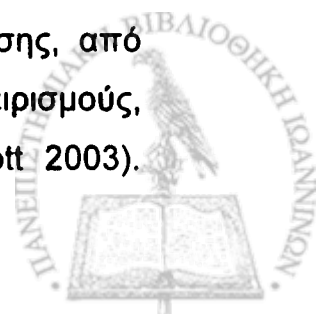
Γλυκόζη → 2αιθανόλη + 2CO₂ (Πορεία Embden-Meyerhof-Parnay)

Γλυκόζη → λακτόζη + αιθανόλη + CO₂ (Ετερογαλακτική Ζύμωση)

Για την ανίχνευση της παρουσίας ή όχι μικροοργανισμών που παράγουν αιθανόλη στα διάφορα βιολογικά υλικά έχει προταθεί η πραγματοποίηση μικροβιολογικών καλλιέργειών (Cohle 1994). Οι μικροβιολογικές καλλιέργειες όμως, σε δείγματα που λαμβάνονται μεταθανάτια, θεωρούνται πολύπλοκες και μη αξιόπιστες, αφού μπορούν να οδηγήσουν εύκολα σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Tsokos et al. 2001). Επιπλέον, έχει προταθεί πως όχι η παρουσία αλλά μόνο η απουσία βακτηρίων ικανών να παράγουν αιθανόλη μπορεί να αποδείξει πως η αιθανόλη που ανιχνεύεται μεταθανάτια προέρχεται από κατάποση "εν ζωή" (Cohle 1994). Μια νέα μέθοδος που εφαρμόστηκε πρόσφατα και δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των πιο συχνά απαντούμενων μικροοργανισμών που παράγουν αιθανόλη, στηρίζεται στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Kupfer et al. 1999, Vu et al. 2000).

Μετά τη δειγματοληψία βιολογικών υλικών που προέρχονται από πτώματα, απουσία συντηρητικού, κατά την παραμονή τους στους 3°C έχει καταγραφεί μείωση αλλά και αύξηση των αρχικών επιπέδων της αιθανόλης (Garriott 2003). Η μείωση αποδόθηκε είτε σε εξάτμιση της αιθανόλης (Brown et al. 1973) είτε σε χημική οξείδωσή της προς οξικό οξύ στα ερυθροκύτταρα (Smalldon et al. 1973). Η τελευταία βρέθηκε ότι ευνοείται από την παρουσία αέρα στα σωληνάρια αιμοληψίας κατά την αποθήκευση των δειγμάτων (Garriott 2003).

Μετά τη δειγματοληψία μεταθανάτιων βιολογικών υλικών έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (μέχρι 40,0 mg/dL) που αποδόθηκε στο μικροβιακό φορτίο του δείγματος (Corry 1978). Στα δείγματα μάλιστα, που προέρχονται από πτώματα, η διαδικασία αυτή ευνοείται ιδιαίτερα αφού η συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα κατά την αλκοολική ζύμωση (γλυκόζη, λιπαρά οξέα, ριβόζη, κτλ) αυξάνεται σημαντικά μεταθανάτια (Garriott 2003). Αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης μπορεί να συμβεί επίσης, από επιμόλυνση με αιθανόλη κατά τους διάφορους εργαστηριακούς χειρισμούς, αφού η αιθανόλη χρησιμοποιείται συχνά ως αντισηπτικό (Garriott 2003).

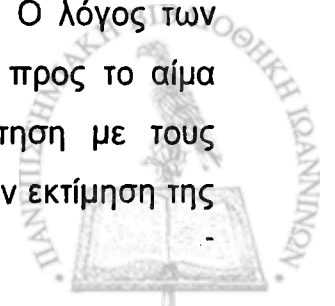


Τέλος, οι απόψεις που επικρατούν για τη δυνατότητα αύξησης των επιπέδων της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια, μετά τη δειγματοληψία, μέσω χημικών και βιοχημικών διεργασιών είναι αντιφατικές. Έχει υποστηριχθεί, ότι είναι πιθανή η παραγωγή αιθανόλης από γαλακτικό οξύ στο αίμα (Bogusz et al.1970, 1972). Η άποψη όμως αυτή παραμένει ασαφής αφού παραγωγή αιθανόλης απουσία μικροοργανισμών δεν έχει καταγραφεί σε άλλες μελέτες (Garriott 2003).

1.5. Κατανομή αιθανόλης στα βιολογικά υλικά.

Με βάση την ισχύουσα νομοθεσία το βιολογικό υλικό που έχει καθοριστεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αιθανόλης είναι το αίμα. Το αίμα αντικατοπτρίζει καλύτερα από όλα τα άλλα βιολογικά υλικά την επίδραση της αιθανόλης στον εγκέφαλο, αφού τα δύο διαμερίσματα βρίσκονται σε ισορροπία, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της αιθανόλης στο αίμα να συσχετίζονται καλύτερα με την κατάσταση του ατόμου τη στιγμή του θανάτου. Είναι πιθανό όμως, να παρατηρηθούν διαφορές μεταξύ της συγκέντρωσης της αιθανόλης που μετράται στο αίμα και στα άλλα βιολογικά υλικά και της πραγματικής συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στον οργανισμό τη στιγμή του θανάτου, εξαιτίας των σηπτικών εξεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα πτώματα.

Κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, θα πρέπει να γίνεται επομένως, δειγματοληψία του καταλληλότερου δείγματος αίματος, ή εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο αίμα, του καταλληλότερου εναλλακτικού βιολογικού υλικού. Απαραίτητα θα πρέπει επίσης να γίνεται δειγματοληψία διαφορετικών βιολογικών υλικών στο ίδιο πτώμα, έτσι ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της προέλευσης της αιθανόλης (κατάποση "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή). Μετά από ανάλυση διαφορετικών βιολογικών υλικών για τον προσδιορισμό των επιπέδων της αιθανόλης, η εύρεση "ακανόνιστης" κατανομής αιθανόλης στους ιστούς του πτώματος αποτελεί ένδειξη μεταθανάτιας παραγωγής (Corry 1978, O'Neal et al. 1996a). Ο λόγος των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων της αιθανόλης στο υγρό προς το αίμα ή/και στον ιστό προς το αίμα χρησιμοποιείται σε συνάρτηση με τους αντίστοιχους λόγους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, για την εκτίμηση της

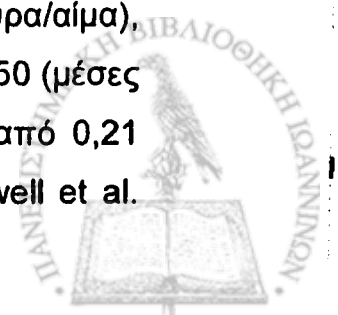


συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα, όταν αυτό δεν είναι διαθέσιμο, ή για την εκτίμηση της ύπαρξης πιθανής παραγωγής αιθανόλης, μεταθανάτια (Budd 1982).

Ο προσδιορισμός διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης κατά την ανάλυση διαφορετικών ιστών και υγρών ενός πτώματος μπορεί να οφείλεται είτε στη μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης είτε στη μεταθανάτια ανακατανομή της αιθανόλης από τους διάφορους ιστούς στο αίμα. Η ανακατανομή της αιθανόλης μπορεί να προκληθεί είτε από την διάχυση αιθανόλης μεταθανάτια από το στομάχι (Plueckhahn et al. 1967, Chikasue et al. 1988) είτε εξαιτίας τραυμάτων (Winek et al. 1995) είτε από την αναρρόφηση γαστρικού περιεχομένου (Pounder et al. 1991, Pelissier-Alicot et al. 2004), από την εκτεταμένη πήξη του αίματος (Shepherd et al. 1992) είτε τέλος, από μηχανικούς παράγοντες όπως η μεταθανάτια κυκλοφορία του αίματος (Corry 1978) και η μετακίνηση του πτώματος κατά την μεταθανάτια διερεύνησή του (Skopp 2004).

Αν ο θάνατος του ατόμου επήλθε κατά τη φάση απορρόφησης της αιθανόλης, η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση της αιθανόλης σε διαφορετικούς ιστούς του πτώματος μπορεί να είναι διαφορετική (Briglia et al. 1992, Sylvester et al. 1998). Διαφορές έχουν καταγραφεί στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης μεταξύ του αρτηριακού και του φλεβικού αίματος ή μεταξύ του αίματος κεντρικών και περιφερικών αρτηριών (Martin et al. 1984, Jones et al. 1989, Sylvester et al. 1998, Levine et al. 2000). Αν το αίμα παραλήφθηκε από τον περικάρδιο σάκο ή από τις πλευρικές κοιλότητες είναι πολύ πιθανό να έχει αναμιχθεί με αιθανόλη που διαχύθηκε από το στομάχι (Plueckhahn et al. 1967). Αν το δείγμα αίματος παραλήφθηκε από την άθικτη καρδιακή κοιλότητα ή την μηριαία αρτηρία τότε είναι απίθανο να έχει επιμολυνθεί με αιθανόλη από άλλη πηγή (Plueckhahn 1967, Plueckhahn et al. 1968).

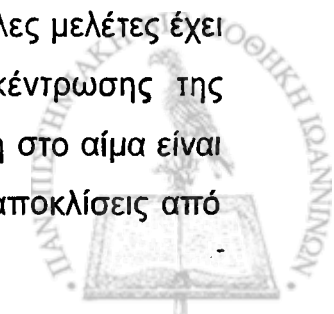
Ένα βιολογικό υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως σαν εναλλακτικό του αίματος για το προσδιορισμό της αιθανόλης μεταθανάτια, είναι τα ούρα. Ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης που μετρήθηκε στα ούρα προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης που μετρήθηκε στο αίμα (λόγος ούρα/αίμα), όπως αναφέρεται σε διάφορες μελέτες, κυμαίνεται μεταξύ 1,01 και 1,50 (μέσες τιμές), ενώ το εύρος των απόλυτων τιμών του λόγου κυμαίνεται από 0,21 μέχρι 3,67 (Jetter 1938, Bavis 1940, Ellenbrook et al. 1943, Coldwell et al.



1959, Heise 1967, Kaye et al. 1969, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982, Stone et al. 1984, Levine et al. 2000, Jones et al. 2003). Εξαιτίας του παρατηρούμενου μεγάλου εύρους στις απόλυτες τιμές του λόγου ούρα/αίμα η μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στα ούρα για την εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικό σφάλμα. Από την άλλη, η χρήση του παραπάνω λόγου μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες είτε για το αν η αιθανόλη κατά τη στιγμή του θανάτου βρισκόταν στο στάδιο της απορρόφησης ή σε στάδιο μετά την απορρόφηση είτε για το αν έχει συμβεί, και σε ποιο βαθμό, μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (Jones 2000).

Εδώ και αρκετά χρόνια το υαλοειδές υγρό αποτελεί ένα πολύ προσφιλές βιολογικό υλικό που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αιθανόλης σε μεταθανάτια περιστατικά. (Felby et al. 1969, Coe et al. 1970, Backer et al. 1980, Carlan et al. 1990, Briglia et al. 1992, Canfield et al. 1993, Sylvester et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Johnson et al. 2004). Το υαλοειδές υγρό είναι ένα περιφερικό υλικό του ανθρώπινου σώματος το οποίο παρουσιάζει καθυστέρηση τόσο στην απορρόφηση όσο και στην απομάκρυνση της αιθανόλης σε σχέση με το αίμα. Επίσης, η δειγματοληψία του κατά την νεκροψία-νεκροτομή γίνεται εύκολα, ενώ εμφανίζεται σχετικά σταθερό μεταθανάτια (δεν επηρεάζεται εύκολα από τα φαινόμενα της σήψης). Σε σχετικές μελέτες έχει δειχθεί ότι ο μέσος όρος του λόγου συγκέντρωση αιθανόλης στο υαλοειδές υγρό προς συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,91 και 1,34 (Felby et al. 1969, Coe et al. 1970, Scott et al. 1974, Backer et al. 1980, Budd 1982, Stone et al. 1984, Sylvester et al. 1998, Κουτσελίνης 2000).

Στο υαλοειδές υγρό έχουν ανιχνευτεί λίγα βακτήρια, ακόμα και σε πτώματα με «μέτριο» βαθμό σήψης. Για το λόγο αυτό έχει θεωρηθεί πως η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης στο υαλοειδές υγρό μπορεί να είναι αμελητέα, και επομένως η απουσία αιθανόλης στο υαλοειδές υγρό, μπορεί με αρκετή βεβαιότητα να σημαίνει ότι δεν υπήρχε αιθανόλη στον οργανισμό τη στιγμή του θανάτου (Zumwalt et al. 1982, Harper 1989). Σε άλλες μελέτες έχει όμως αμφισβητηθεί το κατά πόσο η συσχέτιση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο υαλοειδές υγρό με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο αίμα είναι αξιόπιστη (Chao et al. 1993, Jones et al. 2001). Σημαντικές αποκλίσεις από



τον μέσο όρο στο λόγο της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο υαλοειδές υγρό προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, έχουν καταγραφεί σε άτομα που τη στιγμή του θανάτου η αιθανόλη βρισκόταν στο στάδιο απορρόφησης. Στις περιπτώσεις αυτές ο λόγος κυμαίνονταν από 0,27 μέχρι 1,40. Για τις υπόλοιπες φαρμακοκινητικές φάσεις το εύρος του λόγου ήταν 0,78-3,13 (Chao et al. 1993). Με βάση τα προηγούμενα καθίσταται σαφές ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που προσδιορίζεται στο υαλοειδές υγρό θα πρέπει να χρησιμοποιείται με επιφυλακτικότητα για τον έμμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης στον εγκέφαλο μεταθανάτια, έχει παρουσιάσει διαφοροποιήσεις ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση. Οι απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον εγκέφαλο προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, αναφέρεται ότι κυμαίνονται από 0,31 μέχρι 8,00, γεγονός που δεν πρέπει να προκαλεί εντύπωση αν ληφθεί υπόψη η ανομοιογενής δομή του εγκεφάλου (Gettler et al. 1931, Ellenbrook et al. 1943, Hine 1951, Herold et al. 1960, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982). Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό από την άλλη, αποτελεί ένα υλικό κατάλληλο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται μεταξύ 0,90 και 1,18, ανάλογα με τον χρόνο που έχει περάσει από την κατανάλωση του αλκοολούχου ποτού και την κινητική φάση του μεταβολισμού της αιθανόλης (Gettler et al. 1931, Harger et al. 1937, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982).

Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αρθρικό υγρό έχει συσχετιστεί σε ικανοποιητικό βαθμό με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει πως ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αρθρικό υγρό προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα κυμαίνονταν από 1,06 μέχρι 1,67. Οι τιμές του λόγου εξαρτιόνταν από τη μεταβολική φάση που βρισκόταν η αιθανόλη τη στιγμή του θανάτου (Winek et al. 1993, Ohshima et al. 1997).

Η χολή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτικό υλικό για τον έμμεσο υπολογισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα. Σε σχετική



μελέτη ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στη χολή προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα υπολογίστηκε ότι είναι 0,99 (με εύρος 0,48-2,04) (Backer et al. 1980).

Όσον αφορά σε ιστούς που βρίσκονται κεντρικά στο ανθρώπινο σώμα, η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Έχει αναφερθεί ότι ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο ήπαρ προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,47-0,85 (Christopoulos et al. 1973, Jenkins et al. 1995), ενώ ο αντίστοιχος λόγος νεφροί/αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,57-0,76 (Christopoulos et al. 1973).

Οι μέσες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης του μυελού των οστών προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται μεταξύ 0,34-0,79 (Isokoski et al. 1968, Winek et al. 1980, Winek et al. 1981). Έχουν όμως σημειωθεί μεγάλες εξατομικευμένες αποκλίσεις στο λόγο, εξαιτίας πιθανόν της διαφορετικής περιεκτικότητας σε λίπος του μυελού των οστών από άνθρωπο σε άνθρωπο, με αποτέλεσμα η συσχέτιση της συγκέντρωσης της αιθανόλης του μυελού των οστών με αυτή του αίματος να μη μπορεί να είναι ασφαλής (Isokoski et al. 1968, Winek et al. 1981).

Τέλος, ο σκελετικός μυς έχει θεωρηθεί ικανοποιητικό βιολογικό υλικό, εναλλακτικό του αίματος, για τον προσδιορισμό της αιθανόλης (ακόμα και αν το πτώμα βρίσκεται σε προχωρημένη σήψη), και ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο σκελετικό μύ προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,89-0,91 (Felby et al. 1969, Krauland et al. 1979, Nanikawa et al. 1982). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι λόγοι των συγκεντρώσεων της αιθανόλης στους διάφορους ιστούς προς τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο αίμα που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία.



ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Λόγοι συγκέντρωσης αιθανόλης στα βιολογικά υλικά προς συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα και η σχετική βιβλιογραφία.

Βιολογικά Υλικά	$C_{\text{αίθ}}$ βιολογικών υλικών/ $C_{\text{αίθ}}$ αίματος	Βιβλιογραφία
Ούρα	0,21 – 3,67	Jetter 1938, Bavis 1940, Ellenbrook et al. 1943, Coldwell et al. 1959, Heise 1967, Kaye et al. 1969, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982, Stone et al. 1984, Levine et al. 2000, Jones et al. 2003.
Εγκέφαλος	0,31 – 8,00	Gettler et al. 1931, Ellenbrook et al. 1943, Hine 1951, Herold et al. 1960, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982.
Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό	0,90 – 1,18	Gettler et al. 1931, Harger et al. 1937, Christopoulos et al. 1973, Backer et al. 1980, Budd 1982.
Υαλοειδές Υγρό	0,91 – 1,34	Felby et al. 1969, Coe et al. 1970, Scott et al. 1974, Backer et al. 1980, Budd 1982, Stone et al. 1984, Sylvester et al. 1998.
Αρθρικό Υγρό	1,06 – 1,67	Ohshima et al. 1997, Winek et al. 1993.
Χολή	0,48 – 2,04	Backer et al. 1980.
Ήπαρ	0,47 – 0,85	Christopoulos et al. 1973, Jenkins et al. 1995.
Νεφροί	0,57 – 0,76	Christopoulos et al. 1973.
Μυελός των Οστών	0,34 – 0,79	Isokoski et al. 1968, Winek et al. 1980, Winek et al. 1981.
Σκελετικός Μύς	0,89 – 0,91	Felby et al. 1969, Krauland et al. 1979, Nanikawa et al. 1982.

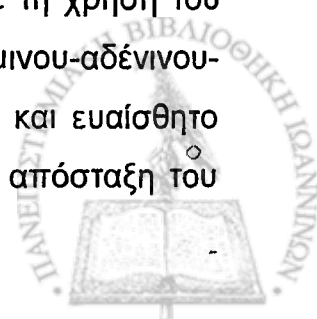
1.6. Μέθοδοι μέτρησης αιθανόλης.

1.6.1. Χημικές Μέθοδοι.

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονταν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης μέχρι το 1950 ήταν όλες χημικές. Στα στάδια των χημικών μεθόδων περιλαμβάνονταν η παραλαβή, με απόσταξη ή εξάτμιση, των πτητικών συστατικών του δείγματος και στην συνέχεια ο προσδιορισμός των αναγωγικών συστατικών του αποστάγματος με τιτλοδότηση με μίγμα διχρωμικού καλίου/θειικού οξέος (Corry 1978). Οι πιο γνωστές χημικές μέθοδοι είναι η “μέθοδος Widmark” καθώς και η τροποποιημένη από τον Cavett “μέθοδος Widmark” (Cavett, 1938; Corry, 1978). Με την μέθοδο αυτή προκύπτουν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα στην περίπτωση που η αιθανόλη είναι το μόνο πτητικό αναγωγικό συστατικό στα εξεταζόμενα δείγματα. Αν υπάρχουν όμως στο δείγμα και άλλες πτητικές αναγωγικές ουσίες, όπως η ακεταλδεϋδη και η μεθανόλη, η μέθοδος δεν είναι ειδική και απαιτεί προηγούμενη επεξεργασία με πολύπλοκες διαδικασίες για την απομάκρυνση των άλλων πτητικών αναγωγικών ουσιών. Η χημική μέθοδος είναι ικανοποιητική για αναλύσεις ρουτίνας δειγμάτων αίματος ή ούρων κλινικών περιστατικών, συντηρημένων ή μη –εκτός από τις περιπτώσεις που κάποιος έχει εισπνεύσει ή καταπιεί μίγμα διαλυτών, ή είναι διαβητικός, οπότε και αυξάνονται τα επίπεδα των κετονοσωμάτων στον οργανισμό του, και κατά συνέπεια τα επίπεδα της ισοπροπανόλης (Corry 1978). Επίσης ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στη σωστή εφαρμογή της μεθόδου, στην καθαριότητα του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού και στην αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από διαλύτες (Corry 1978).

1.6.2. Ενζυμική Μέθοδος.

Στις αρχές της δεκαετίας του '50 αναπτύχθηκε η ενζυμική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης, που περιλάμβανε τη χρήση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και του νικοτινάμινου-αδένινου-δυνουκλεοτιδίου (NAD^+) και επέτρεπε έναν πιο εξειδικευμένο και ευαίσθητο προσδιορισμό των επιπέδων αιθανόλης, χωρίς προηγούμενη απόσταξη του



δείγματος (Bonnichsen et al. 1951, Bücher et al. 1951). Το ένζυμο ADH που χρησιμοποιείται στην ενζυμική μέθοδο προέρχεται από ζύμες και αντιδρά επίσης, αλλά σε μικρότερο βαθμό, με άλλες πρωτοταγείς αλκοόλες όπως η 1-προπανόλη και 1-βουτανόλη. Η δραστηριότητα της ADH ελαττώνεται με την αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας των αλκοολών, ενώ η ταχύτητα της αντίδρασης οξείδωσης από την ADH στην περίπτωση της μεθανόλης είναι πολύ μικρή (Bücher et al. 1951, Van Eys et al. 1957, Smith et al. 1975). Η ενζυμική μέθοδος επηρεάζεται λιγότερο από πιθανή επιμόλυνση του δείγματος από ότι η χημική μέθοδος, έχει όμως τον περιορισμό ότι στα δείγματα δεν πρέπει να προστίθεται συντηρητικό που θα μπορούσε να μειώσει την δραστηριότητα της ADH (φθοριούχα ή υδραργυρικά άλατα που συνήθως προστίθενται στα δείγματα αίματος ή ούρων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται) (Corry 1978).

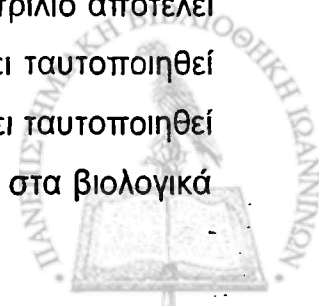
1.6.3. Αέρια χρωματογραφία.

Η αέρια χρωματογραφία καθιερώθηκε ως η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών στα διάφορα βιολογικά υλικά από το 1960 (Tagliaro et al. 1992). Η αέρια χρωματογραφική μέθοδος έδωσε τη δυνατότητα πραγματοποίησης της ποιοτικής ανάλυσης με βάση τους χρόνους έκλουσης των ουσιών και της ποσοτικής ανάλυσης με βάση την ένταση του σήματος που καταγράφεται από ανιχνευτή ιονισμού φλογός (FID). Με τη διάλυση στο δείγμα εσωτερικού προτύπου πριν την ανάλυση, καθώς και με τη χρήση ηλεκτρονικών μέσων για την καταγραφή και την ολοκλήρωση των κορυφών, που αντιστοιχούν σε κάθε ουσία, στα διάφορα χρωματογραφήματα επιτεύχθηκε ακρίβεια στις μετρήσεις των αναλυτών (Corry et al. 1966). Η εισαγωγή της τεχνικής της δειγματοληψίας από την υπερκείμενη αέρια φάση στην αέρια χρωματογραφία, για τη μέτρηση της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά, έγινε τη δεκαετία του '70 (Hs-GC) (Machata 1975). Με την τεχνική αυτή γίνεται έγχυση στη στήλη του χρωματογράφου κλάσματος των υπερκείμενων ατμών του δείγματος που βρίσκονται σε ισορροπία με την υγρή φάση του δείγματος αντί για την απευθείας έγχυση της υγρή φάσης (Machata 1975, Tagliaro et al. 1992). Η μέθοδος της δειγματοληψίας από την υπερκείμενη αέρια φάση, έχει το



πλεονέκτημα της απόλυτης εξειδίκευσης για την αιθανόλη (αλλά και για όποιο πτητικό συστατικό ενδιαφέρει) (Smith et al. 1989). Η προσθήκη συντηρητικών στο δείγμα δεν επηρεάζει την ανάλυση (Corry 1978). Επιπλέον η τεχνική της έγχυσης κλάσματος της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος (Hs-GC) αντί κλάσματος της υγρής, δίνει το πλεονέκτημα της ανάλυσης εκατοντάδων δειγμάτων σε μια στήλη χρωματογράφου χωρίς τον κίνδυνο επιμόλυνσης ή αποσύνθεσης της στερεής φάσης της στήλης από τα υπολείμματα διαφόρων βιολογικών μορίων του δείγματος κυρίως όταν αυτά προέρχονται από πτώματα σε σήψη (Smith et al. 1989). Επίσης, η δυνατότητα αυτόματης δειγματοληψίας από την υπερκείμενη φάση οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ακρίβειας και επαναληπτικότητας της αναλυτικής μεθόδου. Η επαναληψιμότητα της ανάλυσης της αιθανόλης στο αίμα με Hs-GC είναι μικρότερη από 1% (Jones et al. 1989).

Για την σωστή εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται προσεκτική επιλογή των παραμέτρων λειτουργίας του χρωματογράφου, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός της αιθανόλης από τις άλλες πτητικές ουσίες που είναι δυνατόν να βρίσκονται στα διάφορα πτωματικά βιολογικά υλικά (Tangerman 1997). Ο πλήρης διαχωρισμός μεταξύ τους μπορεί να δώσει μια πλήρη εικόνα για τα πτητικά προϊόντα της σήψης, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικές πληροφορίες για την ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην επιλογή του εσωτερικού προτύπου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης (O'Neal et al. 1996b). Η 1-προπανόλη που χρησιμοποιείται από πολλά εργαστήρια ως εσωτερικό πρότυπο παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι έχει ταυτοποιηθεί ως προϊόν σήψης σε μεταθανάτια βιολογικά υλικά (O'Neal et al. 1996a, b). Με τη χρήση της ως εσωτερικό πρότυπο χάνονται σημαντικές πληροφορίες, από την πιθανή παρουσία της στα πτωματικά δείγματα, όσον αφορά στη σήψη και στην παραγωγή αιθανόλης (O'Neal et al. 1996b). Ενώσεις που δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε πτωματικά βιολογικά υλικά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται ως εσωτερικό πρότυπο, όπως η τριτοταγής βουτανόλη, η βουτανόνη ή το ακετονιτρίλιο (O'Neal et al. 1996b). Το ακετονιτρίλιο αποτελεί την πιο ασφαλή επιλογή ως εσωτερικό πρότυπο, αφού δεν έχει ταυτοποιηθεί ως προϊόν αποσύνθεσης, σε αντίθεση με τη βουτανόνη που έχει ταυτοποιηθεί (Corry 1978) και την τριτοταγή βουτανόλη που η παρουσία της στα βιολογικά



υλικά που λαμβάνονται από πτώματα ακόμα ερευνάται (Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993).

1.6.4. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

Μια πιο πρόσφατη μέθοδος προσδιορισμού της αιθανόλης συνδυάζει την αέρια χρωματογραφία για το διαχωρισμό των πτητικών συστατικών με την φασματομετρία μάζας για την ανίχνευσή τους (GC-MS). Η ταυτοποίηση της αιθανόλης γίνεται από τα θραύσματα της μάζας της m/z 31 (βασική κορυφή), m/z 46 (μόριακό ιόν) και m/z 45 (Jones 2000).

Η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας παρότι είναι πολύ ευαίσθητη και παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια δε χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της αιθανόλης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης καθώς και των άλλων πτητικών ουσιών αποτελεί από αναλυτικής άποψης απλή διαδικασία για την οποία η μέθοδος της αέρια χρωματογραφίας με ανιχνευτή FID θεωρείται επαρκής.



1.7. Σκοπός της μελέτης.

Η μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υλικά χρησιμοποιείται συχνά σε αστικά και ποινικά δικαστήρια σαν αποδεικτικό στοιχείο για την απονομή πιθανών ευθυνών. Ο καταλογισμός όμως, οποιασδήποτε ποινικής ευθύνης προϋποθέτει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα τη στιγμή του θανάτου, η οποία συχνά μπορεί να διαφέρει από την μετρούμενη συγκέντρωσή της στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά. Πολλοί παράγοντες έχουν θεωρηθεί υπεύθυνοι για αυτή τη διαφοροποίηση, ο μηχανισμός της δράσης τους όμως, δεν έχει πλήρως διερευνηθεί μέχρι σήμερα. Σαν συνέπεια, ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης στο πτώμα, καθώς και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου παραμένουν άλυτα προβλήματα για την Δικαστική Τοξικολογία.

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι:

α) Η καταγραφή και ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης και των πτητικών συστατικών που ανιχνεύονται στα βιολογικά υλικά (κυρίως στο αίμα) που λαμβάνονται μεταθανάτια κατά τη διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής.

β) Η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα των άλλων πτητικών συστατικών στο αίμα, προκειμένου να καθοριστούν οι πτητικές ουσίες και οι συγκεντρώσεις αυτών που είναι "ενδεικτικές" των σηπτικών εξεργασιών στην προσπάθεια αποσαφήνισης της προέλευσης της αιθανόλης που προσδιορίζεται στο αίμα.

γ) Η διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας, του χρόνου αποθήκευσης και του υπερκείμενου αέρα στους περιέκτες αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών.

δ) Η σύνδεση της παρουσίας και των επιπέδων των πτητικών ουσιών, που είναι "ενδεικτικές" των σηπτικών εξεργασιών, με τη μικροβιακή δραστηριότητα στο αίμα και όχι με άλλα χημικά ή βιοχημικά φαινόμενα.

ε) Η εξαγωγή ποσοτικής σχέσης μεταξύ των προσδιοριζόμενων επιπέδων αιθανόλης και 1-προπανόλης ("δείκτης" μικροβιακής δραστηριότητας) στο αίμα, που να επιτρέπει την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα τη στιγμή του θανάτου.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά.

α. Γενικά.

Η αέρια χρωματογραφία (GC) πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο τύπου Shimadzu GC 17A (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη, υψηλής πολικότητας, επικαλυμμένη με σιλικόνη, τύπου SUPELCOWAX^{TM-10}, μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και διαμέτρου των σωματιδίων επικάλυψης 0,25 μm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή ιονισμού φλογός (Flame Ionization Detector, FID). Ο χρωματογράφος περιλάμβανε σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη από την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος τύπου AOC-5000 (Headspace-GC injection system) (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA), που πραγματοποιούσε αυτόματα την επώαση του δείγματος, τη δειγματοληψία κλάσματος της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και την έγχυση (injection) του κλάσματος στη στήλη. Η θερμοστάτηση του τμήματος έγχυσης του δείγματος (Injector) έγινε στους 105°C και της στήλης στους 60°C. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο με ροή 0,7 ml/min. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή η πίεση του αέρα, του υδρογόνου και του αζώτου ήταν 50 Kpa, 55 Kpa και 75 Kpa, αντίστοιχα.

Για την κατασκευή των προτύπων καμπυλών μέτρησης της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης στο αίμα χρησιμοποιήθηκε αίμα υγιών εθελοντών αιμοδοτών, που ελήφθηκε από την τράπεζα αίματος του Τμήματος Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Το αίμα κατανεμήθηκε σε κλάσματα των 3,0 ml, σε αποστειρωμένα σωληνάρια αιμοληψίας που περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό και καθόλου συντηρητικό (VACUETTE, Greiner Labortechnik, Austria). Τα σωληνάρια με το φυσιολογικό αίμα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση τους. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μέτρησης της αιθανόλης στα ούρα χρησιμοποιήθηκαν ούρα υγιών εθελοντών. Για την κατασκευή της



πρότυπης καμπύλης ακεταλδεΐδης χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός (0,9% w/v NaCl της BIOSER CO, Τρίκαλα, Ελλάδα).

Από τα βιολογικά υλικά που ελήφθησαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, το αίμα συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια αιμοληψίας (VACUETTE, Greiner Labortechnik, Austria), τα ούρα, το υαλοειδές υγρό, η χολή και το περικάρδιο υγρό σε πλαστικά σωληνάρια κωνικού πυθμένα με βιδωτό πώμα για γενικές ούρων και τέλος, τα δείγματα ήπατος και στομαχικού περιεχομένου συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες των 100 mL (VIVE-THEO, ANAPLIOTIS SA, Αυλώνα Αττικής, Ελλάδα). Τα βιολογικά υλικά αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

Για την ανάλυση των δειγμάτων στον αέριο χρωματογράφο χρησιμοποιήθηκαν ειδικά γυάλινα φιαλίδια χρωματογράφου των 10 mL (Chromacol LTD, Trumbull, USA), τα οποία πωματίζονταν αεροστεγώς με πώματα που αποτελούνταν από επιφάνεια σιλικόνης και καπάκι αλουμινίου (Chromacol LTD, Trumbull, USA).

Η 1-προπανόλη, η 2-προπανόλη, το ακετονιτρίλιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ισοαμυλική αλκοόλη, η βουτανόνη, η 1-βουτανόλη, η 2-βουτανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη, το διάλυμα αμμωνίας 25% (v/v), το νατραζίδιο καθώς και το θειικό αμμώνιο ήταν της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany). Η αιθανόλη, καθαρότητας (99,7% v/v), ήταν της εταιρίας AnalaR (Poole, England), η φορμαλδεΐδη 35-40% v/v ήταν της εταιρίας LAB-SCAN (Dublin, Ireland) και η ακεταλδεΐδη 99,5% v/v της εταιρίας Fluka (Buchs, Switzerland). Το φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ήταν της εταιρίας Sigma (St. Louis, USA).

Όλα τα υδατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με χρήση δις απεσταγμένου νερού (Double Distilled Water, DDW), που αποστάχθηκε με την αυτόματη αποστακτική συσκευή τύπου Aquatron A400D (Bibby Sterilin, Staffordshire, UK).

Η ομογενοποίηση έγινε με ομογενοποιητή Polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland).



β. Διαλύματα.

Το πρότυπο διάλυμα αιθανόλης ήταν συγκέντρωσης 4,00% w/v. Τα πρότυπα διαλύματα της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,02% w/v, 0,50% w/v, 0,50% w/v, και 2,00% w/v, αντίστοιχα. Το διάλυμα ακετονιτριλίου (εσωτερικό πρότυπο) παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 100 mg/dL. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι και έξη μήνες. Παρασκευάστηκε διάλυμα αιθανόλης 0,04% w/v για το πείραμα ιχνηθέτησης με τις πολύ μικρές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Τέλος, παρασκευάστηκαν διαλύματα ακεταλδεϋδης 1,00% w/v και 0,04% w/v για το πείραμα ιχνηθέτησης με ακεταλδεϋδη.

Το διάλυμα PBS- NaN_3 (φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με νατραζίδιο) περιείχε 120 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl και 10 mmol/L ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε 1 L H_2O , με pH 7,4 στους 25°C, ενώ προστέθηκε NaN_3 σε τελική συγκέντρωση 0,02% v/v.

2.2. Νεκροτομικό Υλικό.

Πραγματοποιήθηκε συλλογή βιολογικών υλικών από πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια σηπτικών εξεργασιών (πρώιμη ή προχωρημένη σήψη) ή από πτώματα χωρίς εμφανή σηπτικά φαινόμενα, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τα βιολογικά υλικά της μελέτης αποτέλεσαν:

- 195 δείγματα ολικού αίματος που συλλέχθηκαν από την μηριαία αρτηρία, με παρακέντηση με μεγάλη βελόνα,
- 48 δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από την ουροδόχο κύστη με παρακέντηση της περιοχής πάνω από την ηβική σύμφυση,
- 8 δείγματα γαστρικού περιεχομένου,
- 4 δείγματα υαλοειδούς υγρού του οφθαλμού,
- 3 δείγματα χολής,
- 2 δείγματα ήπατος και



– 1 δείγμα περικαρδίου υγρού.

Η πρώτη αέρια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε 2 –8 ώρες μετά τη νεκροτομή.

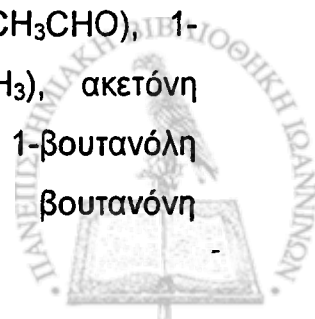
Στις περιπτώσεις που το ιξώδες του υαλοειδούς υγρού ήταν αρκετά μεγάλο ώστε να δυσχεραίνει τη δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 με δις απεσταγμένο νερό (250 μl υαλοειδές υγρό-250 μl νερό). Για την ανάλυση του ήπατος χρησιμοποιήθηκαν 7,01 g του ιστού τα οποία ομογενοποιήθηκαν με 19 mL PBS-Na₃N για την επίτευξη τελικής πυκνότητας ομογενοποιημένου 1,00 g/mL. Τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν χωρίς να υποστούν καμία προηγούμενη επεξεργασία.

2.3. Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία.

Για την αέρια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων για την παρουσία πτητικών ουσιών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: στα φιαλίδια Chromacol (10 mL) προστέθηκαν 0,5 g θειϊκού αμμωνίου μαζί με 0,5 ml δείγματος και 0,5 ml του διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Το θειϊκό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, προκαλώντας την περαιτέρω εξάτμιση των πτητικών ουσιών στην υπερκείμενη φάση. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια πωματίστηκαν ερμητικά με πώματα σιλικόνης και μεταφέρθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη του χρωματογράφου για ανάλυση. Τα φιαλίδια επωάστηκαν για 3,5 min στον επωαστικό θάλαμο στους 50°C, υπό ανάδευση. Ακολούθησε αυτόματη δειγματοληψία 500 μL της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και ένεση στη στήλη του χρωματογράφου.

2.4. Ποιοτική ανίχνευση πτητικών ουσιών.

Κατά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, και ο ποιοτικός προσδιορισμός των παρακάτω πτητικών ουσιών: αιθανόλη (CH₃CH₂OH), ακεταλδεΐδη (CH₃CHO), 1-προπανόλη (CH₃CH₂CH₂OH), 2-προπανόλη (CH₃CHOHCH₃), ακετόνη (CH₃COCH₃), μεθανόλη (CH₃OH), φορμαλδεΐδη (HCHO), 1-βουτανόλη (CH₃CH₂CH₂CH₂OH), 2-βουτανόλη (CH₃CHOHCH₂CH₃), βουτανόνη



($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_3$), οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), ισοαμυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), αμμωνία (NH_3) και ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ένα πρότυπο χρωματογράφημα όπου εμφανίζονται όλες οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν.

Οι ουσίες ανιχνεύτηκαν με βάση τους χρόνους έκλουσης και τη χρήση των αντίστοιχων προτύπων ουσιών. Η επιλογή των ουσιών που αναζητήθηκαν στα βιολογικά υλικά έγινε με βάση τη βιβλιογραφία και τη χημεία αποικοδόμησης των βιολογικών μακρομορίων σε ενώσεις από ένα έως έξι άτομα άνθρακα.

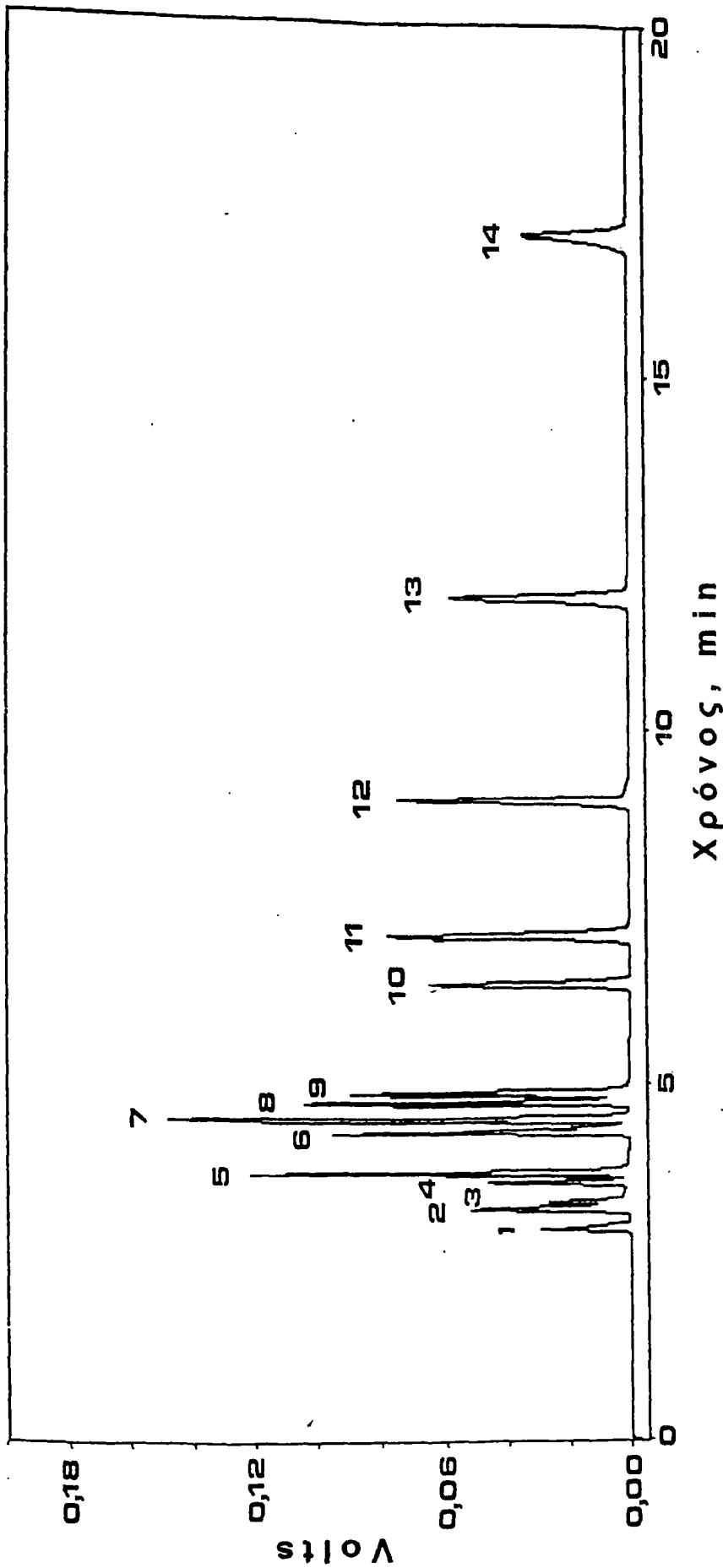
2.5. Ποσοτική ανάλυση αιθανόλης.

Τα πρότυπα δείγματα αίματος για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης παρασκευάστηκαν με τη χρήση αίματος εθελοντή αιμοδότη (αρνητικό για παρουσία αιθανόλης) και του προτύπου διαλύματος αιθανόλης 4,00% w/v, έτσι ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0,00, 50,0, 100, 200 και 400 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της αιθανόλης στο αίμα.

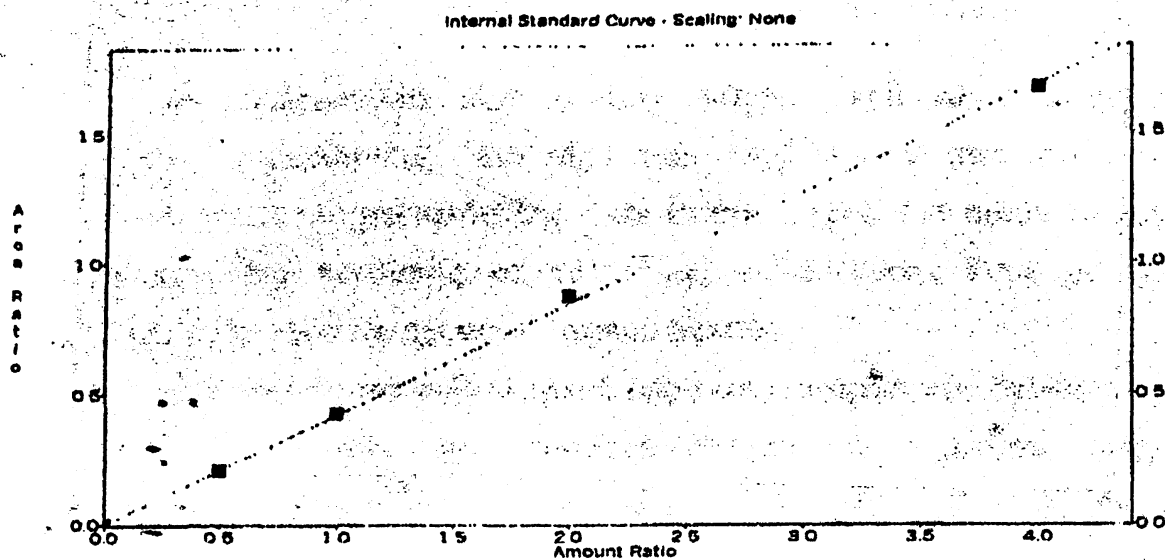
Τα πρότυπα δείγματα ούρων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης παρασκευάστηκαν με τη χρήση ούρων εθελοντή (αρνητικά για παρουσία αιθανόλης) και του προτύπου διαλύματος αιθανόλης 4,00% w/v, έτσι ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0,00, 50,0, 100, 200 και 400 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της αιθανόλης στα ούρα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης στη χολή, στο υαλοειδές υγρό και στο ήπαρ πραγματοποιήθηκε με χρήση της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης για το αίμα, ενώ η ποσοτική ανάλυση της αιθανόλης στο στομαχικό περιεχόμενο και στο περικάρδιο υγρό έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης για τα ούρα.

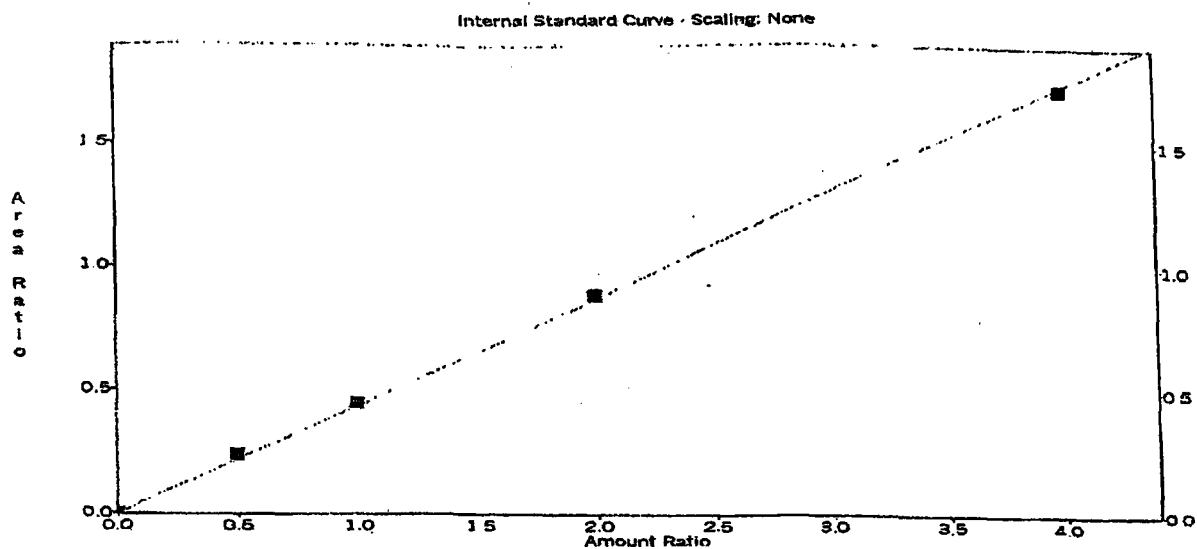




Σχήμα 1: Χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία μίγματος των πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο μίγμα ήταν: (1) αμμωνία, 400 mg/dL, (2) ακεταλδεΰδη, 800 mg/dL, (3) φορμαλδεΰδη, 800 mg/dL, (4) μεθανόλη, 600 mg/dL, (5) ακετόνη, 300 mg/dL, (6) οξικός αιθυλεστέρας, 100 mg/dL, (7) βουτανόλη, 100 mg/dL, (8) 2-προπανόλη, 400 mg/dL, (9) αιθανόλη, 600 mg/dL, (10) ακετονιτρίλιο (εσωτερικό πρότυπο), 200 mg/dL, (11) 1-προπανόλη, 400 mg/dL, (12) 2-βουτανόλη, 200 mg/dL, (13) 1-βουτανόλη, 300 mg/dL, (14) ισοαμλική αλκοόλη 300 mg/dL. Οι συνθήκες της χρωματογραφίας αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.1.



Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-400 mg/dL ($R^2 = 0,9994$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.5.).



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στα ούρα με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-400 mg/dL ($R^2 = 0,9996$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.5.).

2.6. Ποσοτική ανάλυση ακεταλδεϋδης, 1-προπανόλης, 2-προπανόλης και ακετόνης.

Στο φυσιολογικό αίμα υπήρχε πάντα μικρή αλλά ανιχνεύσιμη ποσότητα ακεταλδεϋδης. Στο αίμα που λαμβάνονταν από πτώματα οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης ήταν επίσης μικρές. Για αυτόν το λόγο η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της ακεταλδεϋδης έγινε με χρήση φυσιολογικού ορού και όχι φυσιολογικού αίματος.

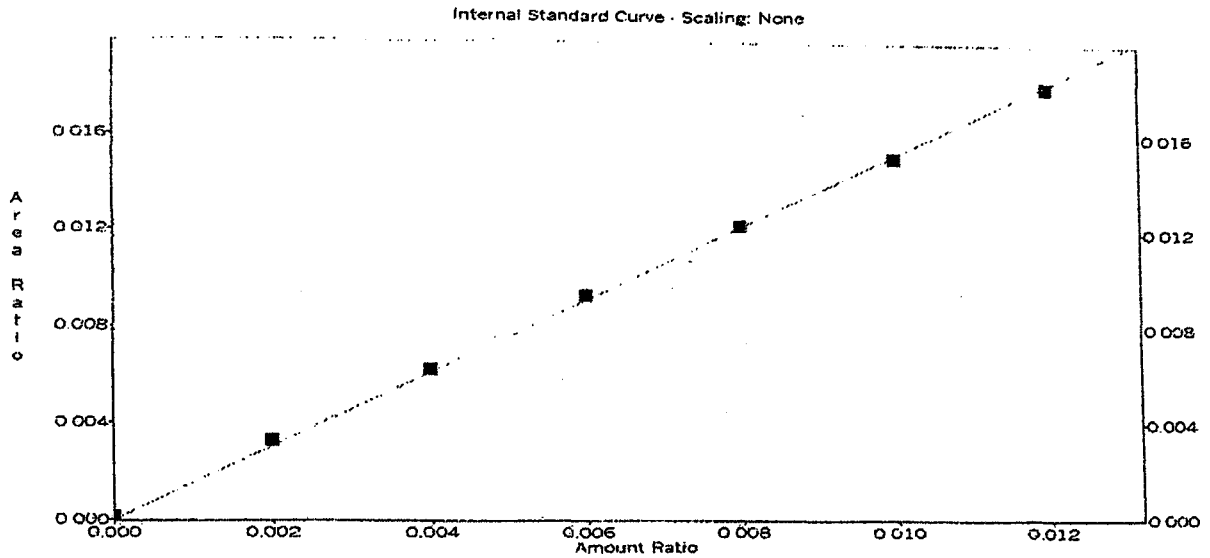
Με τη χρήση του φυσιολογικού ορού και του προτύπου διαλύματος της ακεταλδεϋδης 0,02% w/v παρασκευάστηκαν τα πρότυπα δείγματα ακεταλδεϋδης συγκεντρώσεων 0,00, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,00 και 1,20 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα ακεταλδεϋδης αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία όπως περιγράφηκε παραπάνω και στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της ακεταλδεϋδης.

Τα πρότυπα δείγματα αίματος για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της 1-προπανόλης παρασκευάστηκαν με τη χρήση αίματος εθελοντή αιμοδότη (αρνητικό για παρουσία 1-προπανόλης) και του προτύπου διαλύματος 1-προπανόλης 0,50% w/v, έτσι ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0,00, 2,00, 4,00, 8,00, 10,0 και 15,0 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της 1-προπανόλης στο αίμα. Η ίδια καμπύλη χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 1-προπανόλης στα ούρα καθώς και στα υπόλοιπα βιολογικά υλικά.

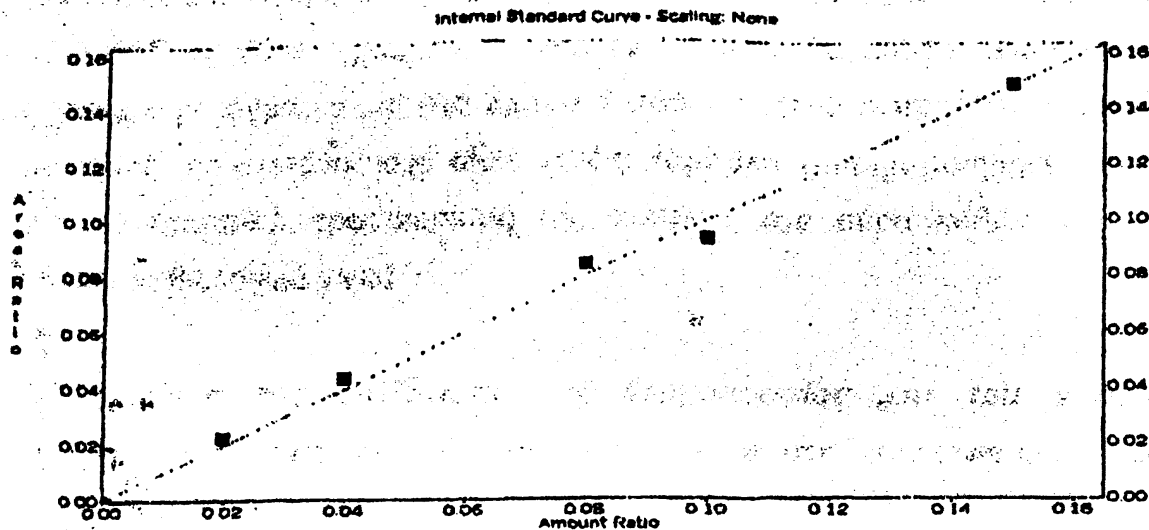
Τα πρότυπα δείγματα αίματος για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της 2-προπανόλης παρασκευάστηκαν με τη χρήση αίματος εθελοντή αιμοδότη (αρνητικό για παρουσία 2-προπανόλης) και του προτύπου διαλύματος 2-προπανόλης 0,50% w/v, έτσι ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0,00, 1,00, 2,00, 4,00, 6,00, 8,00 και 10,0 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της 2-προπανόλης στο αίμα. Η ίδια καμπύλη χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 2-προπανόλης στα ούρα καθώς και στα υπόλοιπα βιολογικά υλικά.

Τα πρότυπα δείγματα αίματος για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της ακετόνης παρασκευάστηκαν με τη χρήση αίματος εθελοντή

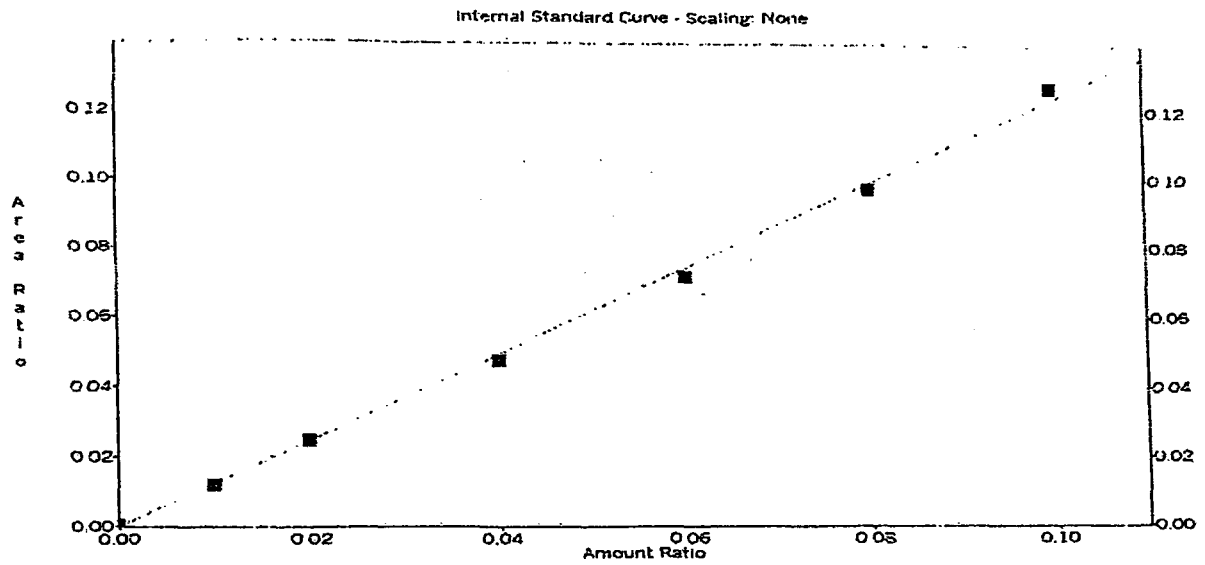




Σχήμα 4: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-1,20 mg/dL ($R^2 = 0,9994$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.6.).



Σχήμα 5: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-15,0 mg/dL ($R^2 = 0,9920$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.6.).



Σχήμα 6: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 2-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-10,0 mg/dL ($R^2 = 0,9979$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.6.).

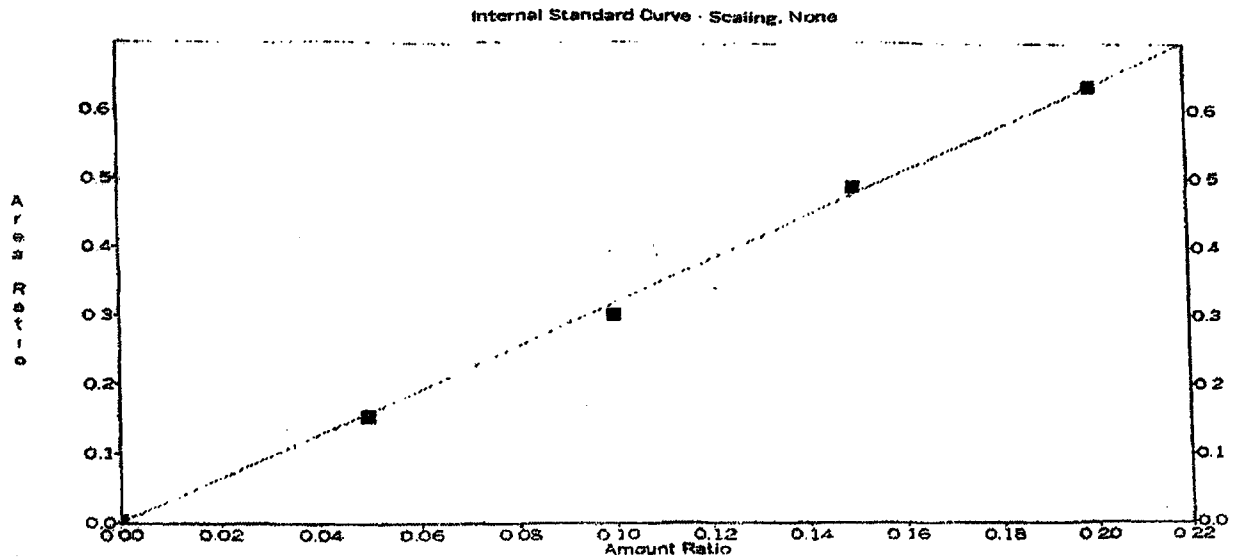
αιμοδότη (αρνητικό για παρουσία ακετόνης) και του προτύπου διαλύματος ακετόνης 2,00% w/v, έτσι ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0,00, 5,00, 10,0, 15,0 και 20,0 mg/dL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και στο Σχήμα 7 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη μέτρησης της ακετόνης στο αίμα. Η ίδια καμπύλη χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ακετόνης στα ούρα καθώς και στα υπόλοιπα βιολογικά υλικά.

2.7. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών.

Αίμα όγκου 4,0 mL, που συλλέχθηκε από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας και επωάστηκε στους 4°C για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Την ημέρα 0, 10, 20, 40, 60 και 90, αντίστοιχα, τα σωληνάρια ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπωματίστηκαν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης ενώ για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος. Μελετήθηκαν 10 δείγματα αίματος από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων.

Ούρα όγκου 4,0 mL, που συλλέχθηκαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια και επωάστηκαν στους 4°C για χρονικό διάστημα 40 ημερών. Την ημέρα 0, 10, 20, και 40 αντίστοιχα, τα σωληνάρια ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος ούρων 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπωματίστηκαν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης, ενώ για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος. Μελετήθηκαν 10 δείγματα ούρων από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων.





Σχήμα 7: Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακετόνης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-20,0 mg/dL ($R^2 = 0,9983$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων (Κεφάλαιο 2.6.).

Αίμα όγκου 4,0 mL, που συλλέχθηκε από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας και επωάστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Θ.Π.) (22-27°C) και στους 4°C (δείγματα ελέγχου) για χρονικό διάστημα 25 ημερών. Την ημέρα 0, 3, 7, 10, 15, 20 και 25, αντίστοιχα, τα σωληνάρια ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπρωματίστηκαν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης, ενώ για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος. Μελετήθηκαν 10 δείγματα αίματος από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων.

Ούρα όγκου 4,0 mL, που συλλέχθηκαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 4°C (δείγματα ελέγχου) για χρονικό διάστημα 10 ημερών. Την ημέρα 0, 3, 7, 10, 15, 20 και 25 αντίστοιχα, τα σωληνάρια ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος ούρων 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπρωματίστηκαν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης, ενώ για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος. Μελετήθηκαν δύο δείγματα ούρων από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων.

2.8. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών.

Αίμα εθελοντή αιμοδότη όγκου 1200 mL τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας και ιχνηθετήθηκε με αιθανόλη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιθανόλης στα δείγματα να είναι 0,00, 0,10, 1,00, 10,0, 25,0, 50,0, 100, 200, 300 και 400 mg/dL αντίστοιχα. Για τις συγκεντρώσεις 0,10 mg/dL και 1,00 mg/dL χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα της αιθανόλης 0,04% w/v και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις το 4,00% w/v. Στη συνέχεια τα σωληνάρια



επώαστηκαν στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σκοτεινό θάλαμο για 90 ημέρες. Για κάθε συγκέντρωση αιθανόλης ετοιμάστηκαν σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν για αντίστοιχες μετρήσεις με αέρια χρωματογραφία κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα της επώασης, αντίστοιχα. Από κάθε δείγμα αίματος έγιναν δύο μετρήσεις. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης στα αντίστοιχα δείγματα αίματος. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Αίμα εθελοντή αιμοδότη όγκου 1200 μL τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας και ιχνηθετήθηκε με ακεταλδεΐδη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στα δείγματα να είναι 0,00, 0,10, 1,00, 10,0, 25,0, 50,0 και 100 mg/dL αντίστοιχα. Για τις συγκεντρώσεις 0,10 mg/dL και 1,00 mg/dL χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα της ακεταλδεΐδης 0,04% w/v και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις το 1,00% w/v. Στη συνέχεια τα σωληνάρια επώαστηκαν στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σκοτεινό θάλαμο για 90 ημέρες. Για κάθε συγκέντρωση ακεταλδεΐδης ετοιμάστηκαν σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν για αντίστοιχες μετρήσεις με αέριο χρωματογραφία κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα της επώασης, αντίστοιχα. Από κάθε δείγμα αίματος έγιναν δύο μετρήσεις. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης στα αντίστοιχα δείγματα αίματος. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Αίμα εθελοντή αιμοδότη όγκου 1200 μL τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας και ιχνηθετήθηκε με αιθανόλη και ακεταλδεΐδη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιθανόλης και ακεταλδεΐδης στα δείγματα να είναι (α) αιθανόλη 0,00 mg/dL-ακεταλδεΐδη 0,00 mg/dL, (β) αιθανόλη 50,0 mg/dL-ακεταλδεΐδη 1,00 mg/dL, (γ) αιθανόλη 100 mg/dL-ακεταλδεΐδη 1,00 mg/dL, (δ) αιθανόλη 50,0 mg/dL-ακεταλδεΐδη 10,0 mg/dL, (ε) αιθανόλη 50,0 mg/dL-ακεταλδεΐδη 50,0 mg/dL. Για τα ζεύγη των συγκεντρώσεων (β) και (γ) χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα της αιθανόλης 4,00% w/v και της ακεταλδεΐδης 0,04% w/v και για τα ζεύγη (δ) και (ε) τα πρότυπα διαλύματα της αιθανόλης 4,00% w/v και της ακεταλδεΐδης 1,00% w/v. Στη συνέχεια τα σωληνάρια

επωάστηκαν στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σκοτεινό θάλαμο για 90 ημέρες. Για κάθε ζεύγος συγκεντρώσεων ετοιμάστηκαν σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν για αντίστοιχες μετρήσεις με αέριο χρωματογραφία κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα επώασης, αντίστοιχα. Από κάθε δείγμα αίματος έγιναν δύο μετρήσεις. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Λόγω της μεγάλης πτητικότητας της ακεταλδεϋδης (σ.ζ. 21°C), η ιχνηθέτηση με ακεταλδεϋδη καθώς και η προετοιμασία των δειγμάτων για μέτρηση στον αέριο χρωματογράφο πραγματοποιήθηκε στο ψυχρό θάλαμο, έτσι ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο η εξάτμισή της.

2.9. Μελέτη της επίδρασης του υπερκείμενου αέρα των περιεκτών αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών.

Κλάσμα αίματος ή ούρων όγκου 0,5 mL, από δείγματα που ελήφθησαν μεταθανάτια, τοποθετήθηκε σε φιαλίδια chromacol (πέντε φιαλίδια). Τα φιαλίδια πωματίστηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό θάλαμο, για 7, 10, 15, 20 και 25 ημέρες, αντίστοιχα (7^η ημέρα το 1^ο φιαλίδιο, 10^η ημέρα το 2^ο φιαλίδιο κ.ο.κ.). Κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιούνταν καθημερινά ήπια ανάδευση των φιαλιδίων. Την ημέρα της μέτρησης το αντίστοιχο φιαλίδιο τοποθετήθηκε για μισή ώρα στο ψυγείο (4°C) έτσι ώστε κατά το άνοιγμά του να ελαχιστοποιείται η εξάτμιση των πτητικών ουσιών που περιείχε. Μετά το άνοιγμα του πώματος προστέθηκαν 0,5 mL του διαλύματος εσωτερικού προτύπου και 0,5 g θειικό αμμώνιο. Το φιαλίδιο πωματίστηκε ξανά και τοποθετήθηκε για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις. Μελετήθηκαν πέντε δείγματα αίματος και ένα δείγμα ούρων. Δείγματα ελέγχου (control) αποτέλεσαν κλάσματα του αντίστοιχου δείγματος αίματος ή ούρων που επωάστηκαν για αντίστοιχες ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σωληνάρια αιμοληψίας ή πλαστικά σωληνάρια για αίμα και ούρα αντίστοιχα.



Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

2.10. Μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά τον ενοφθαλμισμό του με αίμα πτώματος.

2.10.1. Έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης αίματος πτώματος.

α. Περιστατικό 1

Αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκε στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντίστοιχα. Κατά την ημέρα 0, 8, 10, 14 και 20 έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL και μέτρηση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης και της 1-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία.

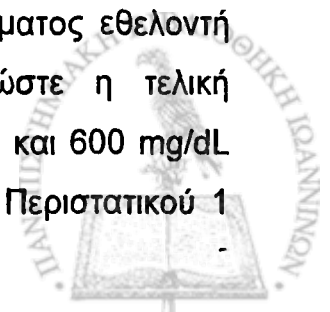
β. Περιστατικό 2

Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκε στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντίστοιχα. Κατά την ημέρα 0, 8, 10, 14 και 20 έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL και μέτρηση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης και της 1-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία.

2.10.2. Ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος.

α. Περιστατικό 1

Σε σωληνάρια αιμοληψίας τοποθετήθηκαν 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη τα οποία ιχνηθετήθηκαν με αιθανόλη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή της στα δείγματα να είναι 0,00, 50,0, 100, 300 και 600 mg/dL αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL αίματος του Περιστατικού 1



που είχε παραμείνει για 24 ημέρες στους 4°C και κατά την πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροψία- νεκροτομή παρουσίασε ενδείξεις σηπτικών εξεργασιών (παρουσία 1-προπανόλης). Τα σωληνάρια πωματίστηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σκοτεινό θάλαμο. Την 0^η, 1^η, 3^η, 6^η, 10^η και 17^η ημέρα της επώασης ελήφθησε κλάσμα αίματος 0,5 mL από τα αντίστοιχα σωληνάρια και αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία. Δείγματα ελέγχου (controls) αποτέλεσαν δύο σειρές αντίστοιχου αριθμού σωληναρίων αιμοληψίας που περιείχαν 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένα με αντίστοιχες ποσότητες αιθανόλης που επωάστηκαν για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην πρώτη σειρά δειγμάτων ελέγχου προστέθηκαν 200 μL αίματος από πτώμα που δεν παρουσίαζε ενδείξεις σηπτικών εξεργασιών (απουσία 1-προπανόλης κατά την πρώτη χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροψία- νεκροτομή) ενώ στη δεύτερη δεν προστέθηκε καθόλου αίμα από πτώμα. Τα δείγματα ελέγχου αναλύθηκαν τις αντίστοιχες ημέρες μέτρησης.

β. Περιστατικό 2

Σε σωληνάρια αιμοληψίας τοποθετήθηκαν 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη τα οποία ιχνηθετήθηκαν με αιθανόλη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή της στα δείγματα να είναι 0,00, 50,0, 100 και 200 mg/dL, αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL αίματος του Περιστατικού 2 που κατά την πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή παρουσίασε ενδείξεις σηπτικών εξεργασιών (παρουσία 1-προπανόλης). Τα σωληνάρια πωματίστηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σκοτεινό θάλαμο. Την 0^η, 1^η, 3^η, 6^η, 10^η και 17^η, ημέρα επώασης ελήφθησαν κλάσματα αίματος 0,5 mL από τα αντίστοιχα σωληνάρια και αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία. Δείγματα ελέγχου (controls) αποτέλεσαν δύο σειρές αντίστοιχου αριθμού σωληναρίων αιμοληψίας που περιείχαν 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένα με αντίστοιχες ποσότητες αιθανόλης που επωάστηκαν για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην πρώτη σειρά δειγμάτων ελέγχου προστέθηκαν 200 μL αίματος από πτώμα που δεν παρουσίαζε ενδείξεις σηπτικών εξεργασιών (απουσία 1-προπανόλης κατά την πρώτη



χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροτομή) ενώ στη δεύτερη δεν προστέθηκε καθόλου αίμα από πτώμα. Τα δείγματα ελέγχου αναλύθηκαν τις αντίστοιχες ημέρες μέτρησης.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ουσιών στα βιολογικά υλικά ήταν η αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης (Headspace-GC), η οποία αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ανάλυση της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών που υπάρχουν σε βιολογικά υλικά (Tagliaro et al. 1992). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί τροποποίηση προηγούμενης μεθόδου (Machata 1975, Tagliaro et al. 1992).

Για το διαχωρισμό των πτητικών ουσιών επιλέχθηκε η στήλη SUPELCOWAX^{TM-10} που επέτρεπε την έκλουση και το διαχωρισμό πολικών ενώσεων με βάση την πολικότητα και τα μοριακά βάρη. Η θερμοστάτηση της στήλης έγινε στους 60°C. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ουσιών: αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη, βουτανόνη, οξικός αιθυλεστέρας, ισοαμυλική αλκοόλη, αμμωνία και ακετονιτρίλιο, σε 20 min. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ένα πρότυπο χρωματογράφημα όπου εμφανίζονται όλες οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο ως εσωτερικό πρότυπο. Η επιλογή του ακετονιτρίλιου ως εσωτερικού προτύπου έγινε με βάση τα παρακάτω κριτήρια: (α) δεν αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον ανθρώπινο οργανισμό και (β) δεν αποτελεί οργανικό προϊόν αποσύνθεσης μεταθανάτια (O' Neal et al. 1996b).

Η πρώτη μέτρηση των δειγμάτων του βιολογικού υλικού πραγματοποιήθηκε 2-8 ώρες μετά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν δύο φορές.



3.2. Προσδιορισμός πτητικών στα βιολογικά υλικά.

Έγινε αέρια χρωματογραφική ανάλυση για την παρουσία πτητικών ουσιών σε διάφορα βιολογικά υλικά που ελήφθησαν από πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια σηπτικών εξεργασιών (χωρίς εμφανείς σηπτικές εξεργασίες, σε αρχόμενη σήψη ή σε προχωρημένη σήψη). Τα δείγματα ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας. Όλα τα περιστατικά από τα οποία ελήφθησαν τα δείγματα ήταν βίαιοι ή αιφνίδιοι θάνατοι. Η επιλογή των δειγμάτων ήταν τυχαία. Στα αναλυθέντα δείγματα επιλέχθηκε να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός αφενός της αιθανόλης και αφετέρου της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης, για τους παρακάτω λόγους:

- Η ακεταλδεΐδη αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της αιθανόλης συνεπώς, η μεταβολή της συγκέντρωσής της είναι πιθανόν να συσχετίζεται με τα επίπεδα της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Skopp 2004, Lewis et al. 2004).
- Η 1-προπανόλη θεωρείται προϊόν της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη σήψη των πτωμάτων και η ανίχνευσή της στα βιολογικά υλικά έχει θεωρηθεί ενδεικτική της ύπαρξης σηπτικών εξεργασιών και της μεταθανάτιας παραγωγής της αιθανόλης (Davis et al. 1972, Nanikawa et al. 1982, Kuhlman et al. 1991, Takayasu et al. 1995a, O'Neal et al. 1996a, Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004, Skopp 2004, Moriya et al. 2004).
- Η 2-προπανόλη (όπως και η ακετόνη) ανιχνεύεται στα βιολογικά υλικά τόσο ζώντων ατόμων όσο και πτωμάτων (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Grellner et al. 1997, Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004, Skopp 2004).
- Η ακετόνη αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον ανθρώπινο οργανισμό (ανήκει στα κετονοσώματα) (Kalapos 2003).

Το όριο ανίχνευσης καθεμιάς από τις προσδιοριζόμενες πτητικές ουσίες ήταν 0,01 mg/dL.



3.2.1. Προσδιορισμός πτητικών στο αίμα.

α. Προσδιορισμός των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών.

Αναλύθηκαν 195 δείγματα αίματος που ελήφθησαν από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ($C_{αιθ}$) που μετρήθηκαν στα 195 δείγματα του αίματος κυμάνθηκαν από 0,00 mg/dL έως 555 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης ($C_{ακεταλ}$) κυμάνθηκαν από 0,00 mg/dL ως 2,42 mg/dL, της 1-προπανόλης ($C_{1προπ}$) από 0,00 mg/dL ως 11,8 mg/dL, της 2-προπανόλης ($C_{2προπ}$) από 0,00 mg/dL ως 15,4 mg/dL και της ακετόνης ($C_{ακετον}$) από 0,02 mg/dL ως 12,5 mg/dL.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου: 1/195 δείγματα αίματος για την αιθανόλη, 2/195 δείγματα αίματος για την ακεταλδεϋδη, 143/195 δείγματα αίματος για την 1-προπανόλη, 63/195 δείγματα αίματος για την 2-προπανόλη και τέλος, 0/195 δείγματα αίματος για την ακετόνη.

Κατά την ανάλυση των 195 δειγμάτων αίματος ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Η κατάταξη των δειγμάτων αίματος έγινε σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης που προσδιορίστηκαν σε αυτά. Στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} \geq 300$ mg/dL, που θεωρείται τοξική για τον οργανισμό. Στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης $50,0 \text{ mg/dL} \leq C_{αιθ} < 300$ mg/dL, που θεωρείται «ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης αλλά μη τοξική. Στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης $10,0 \text{ mg/dL} \leq C_{αιθ} < 50,0$ mg/dL, που θεωρείται μη «ένοχη» συγκέντρωση. Τέλος, στην ομάδα Δ κατατάχτηκαν τα δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 10,0$ mg/dL, που θεωρείται πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων αίματος σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.



ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ουσιών στο αίμα που συλλέχθηκε από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής.

Πτητικές ουσίες	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό (%)
Αμμωνία	195	100
Οξικός αιθυλεστέρας	49	25
Βουτανόνη	49	25
2-βουτανόλη	40	20
Μεθανόλη	34	17
Ισοαμυλική αλκοόλη	15	8
1-βουτανόλη	13	7



ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Κατάταξη των δειγμάτων αίματος σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της αιθανόλης.

Ομάδες	Συγκέντρωση Αιθανόλης ($C_{αιθ}$), mg/dL	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{αιθ} \geq 300$	7	3,6
B	$50,0 \leq C_{αιθ} < 300$	24	12,3
Γ	$10,0 \leq C_{αιθ} < 50,0$	15	7,7
Δ	$C_{αιθ} < 10,0$	149	76,4



Βρέθηκαν 7/195 δείγματα (3,6%) με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} \geq 300$ mg/dL (ομάδα Α), 24/195 (12,3%) με συγκέντρωση αιθανόλης $50,0 \text{ mg/dL} \leq C_{αιθ} < 300$ mg/dL (ομάδα Β), 15/195 δείγματα (7,7%) με συγκέντρωση αιθανόλης $10,0 \text{ mg/dL} \leq C_{αιθ} < 50,0$ mg/dL (ομάδα Γ) και τέλος, 149/195 δείγματα (76,4%) με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 10,0$ mg/dL. (ομάδα Δ).

Τα δείγματα αίματος κατατάχτηκαν επίσης, με βάση τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης, σε τέσσερις ομάδες ως εξής: τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{ακεταλ} \geq 1,00$ mg/dL κατατάχτηκαν στην ομάδα Α, τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $0,50 \text{ mg/dL} \leq C_{ακεταλ} < 1,00$ mg/dL κατατάχτηκαν στην ομάδα Β, τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{ακεταλ} < 0,50$ mg/dL κατατάχτηκαν στην ομάδα Γ και τέλος, τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{ακεταλ} < 0,10$ mg/dL κατατάχτηκαν στην ομάδα Δ. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων αίματος σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.

Βρέθηκαν 10/195 δείγματα αίματος (5,1%) με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{ακεταλ} \geq 1,00$ mg/dL (ομάδα Α), 28/195 δείγματα (14,4%) με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $0,50 \text{ mg/dL} \leq C_{ακεταλ} < 1,00$ mg/dL (ομάδα Β), 83/195 δείγματα (42,6%) με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{ακεταλ} < 0,50$ mg/dL (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 74/195 δείγματα (37,9%) με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{ακεταλ} < 0,10$ mg/dL (ομάδα Δ).

Με βάση τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης τα δείγματα αίματος κατατάχτηκαν επίσης σε τέσσερις ομάδες, ως εξής: στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1προπ} \geq 9,00$ mg/dL, στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $3,00 \text{ mg/dL} \leq C_{1προπ} < 9,00$ mg/dL, στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{1προπ} < 3,00$ mg/dL και τέλος, στην ομάδα Δ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1προπ} < 0,10$ mg/dL. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων αίματος σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.

Βρέθηκαν 3/195 δείγματα (1,5%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1προπ} \geq 9,00$ mg/dL (ομάδα Α), 3/195 δείγματα (1,5%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης



ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Κατάταξη των δειγμάτων αίματος σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης.

Ομάδες	Συγκέντρωση ακεταλδεϋδης ($C_{\text{ακεταλ}}$) mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{\text{ακεταλ}} \geq 1,00$	10	5,1
B	$0,50 \leq C_{\text{ακεταλ}} < 1,00$	28	14,4
Γ	$0,10 \leq C_{\text{ακεταλ}} < 50,0$	83	42,6
Δ	$C_{\text{ακεταλ}} < 10,0$	74	37,9



ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Κατάταξη των δειγμάτων αίματος σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης.

Ομάδες	Συγκέντρωση 1-προπανόλης ($C_{1\text{προπ}}$) mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{1\text{προπ}} \geq 9,00$	3	1,5
B	$3,00 \leq C_{1\text{προπ}} < 9,00$	3	1,5
Γ	$0,10 \leq C_{1\text{προπ}} < 3,00$	17	8,7
Δ	$C_{1\text{προπ}} < 0,10$	172	88,3



$3,00 \text{ mg/dL} \leq C_{1\text{προπ}} < 9,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Β), 17/195 δείγματα (8,7%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{1\text{προπ}} < 3,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 172/195 δείγματα (88,3%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα 143 δείγματα αίματος που η 1-προπανόλη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (ομάδα Δ).

Τα δείγματα αίματος κατατάχτηκαν επίσης σε τέσσερις ομάδες, με βάση τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης, ως εξής: στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2\text{προπ}} \geq 10,0 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 2-προπανόλης $1,00 \text{ mg/dL} \leq C_{2\text{προπ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 2-προπανόλης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{2\text{προπ}} < 1,00 \text{ mg/dL}$ και τέλος, στην ομάδα Δ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων αίματος σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.

Βρέθηκε 1/195 δείγματα αίματος (0,5%) με συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2\text{προπ}} \geq 10,0 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Α), 4/195 δείγματα (2,1%) με συγκέντρωση 2-προπανόλης $1,00 \text{ mg/dL} \leq C_{2\text{προπ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Β), 26/195 δείγματα (13,3%) με συγκέντρωση 2-προπανόλης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{2\text{προπ}} < 1,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 164/195 δείγματα (84,1%) με συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα 63 δείγματα αίματος που η 2-προπανόλη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (ομάδα Δ).

Τέλος, τα δείγματα αίματος κατατάχτηκαν με βάση τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της ακετόνης, σε τέσσερις ομάδες ως εξής: στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετον}} \geq 4,00 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης $1,00 \text{ mg/dL} \leq C_{\text{ακετον}} < 4,00 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης $0,50 \text{ mg/dL} \leq C_{\text{ακετον}} < 1,00 \text{ mg/dL}$ και τέλος, στην ομάδα Δ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετον}} < 0,50 \text{ mg/dL}$. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων αίματος σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.



ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Κατάταξη των δειγμάτων αίματος σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης.

Ομάδες	Συγκέντρωση 2-προπανόλης ($C_{2\text{προπ}}$) (mg/dL)	Αριθμός Δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{2\text{προπ}} \geq 10,0$	1	0,5
B	$1,00 \leq C_{2\text{προπ}} < 10,00$	4	2,1
Γ	$0,10 \leq C_{2\text{προπ}} < 1,00$	26	13,3
Δ	$C_{2\text{προπ}} < 0,10$	164	84,1



ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Κατάταξη των δειγμάτων αίματος σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της ακετόνης.

Ομάδες	Συγκέντρωση ακετόνης (mg/dL)	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{\text{ακετόν}} \geq 4,00$	3	1,6
B	$1,00 \leq C_{\text{ακετόν}} < 4,00$	9	4,6
Γ	$0,50 \leq C_{\text{ακετόν}} < 1,00$	9	4,6
Δ	$C_{\text{ακετόν}} < 0,50$	174	89,2



Βρέθηκαν 3/195 δείγματα αίματος (1,6%) με συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετόν}} \geq 4,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Α), 9/195 δείγματα (4,6%) με συγκέντρωση ακετόνης $1,00 \text{ mg/dL} \leq C_{\text{ακετόν}} < 4,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Β), 9/195 δείγματα (4,6%) με συγκέντρωση ακετόνης $0,50 \text{ mg/dL} \leq C_{\text{ακετόν}} < 1,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 174/195 δείγματα (89,2%) με συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετόν}} < 0,50 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Δ).

β. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης.

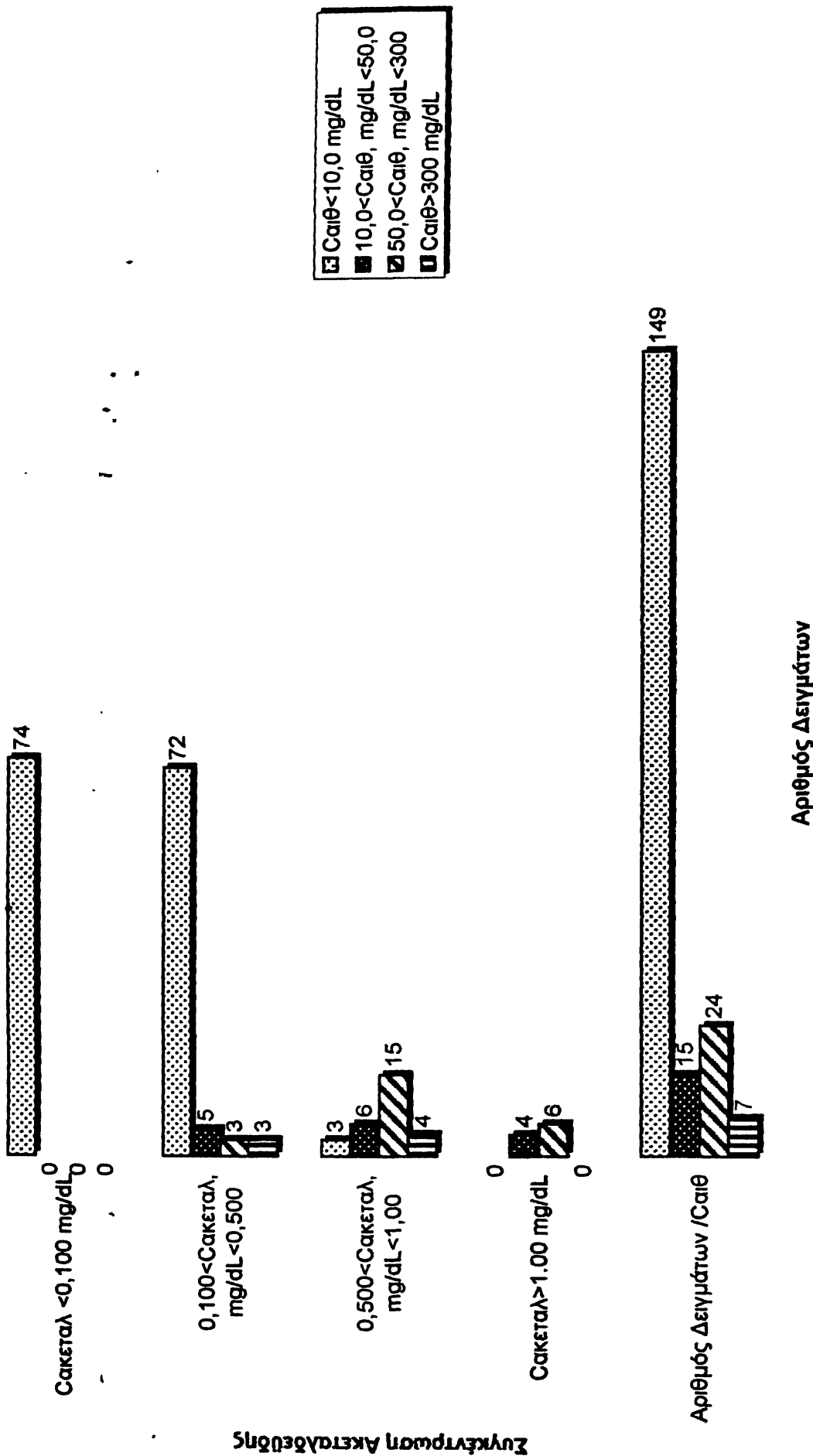
Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης συσχετίστηκαν με τις συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στα δείγματα του αίματος που μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα της συσχέτισης παρουσιάζονται στο Σχήμα 8. Από τα 149 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{\text{αιθ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$, τα 74 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{\text{ακεταλ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$. Τα 72/149 δείγματα αίματος είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 0,50 mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα 3/149 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL.

Από τα 15 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, τα 5 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 0,50 mg/dL. Τα 6/15 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL, ενώ τα 4/15 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}} > 1,00 \text{ mg/dL}$.

Από τα 24 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, τα 3 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 0,50 mg/dL. Τα 15/24 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL, ενώ τα 6/15 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}} > 1,00 \text{ mg/dL}$.

Από τα 7 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ ήταν $\geq 300 \text{ g/L}$, τα 3 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 0,50 mg/dL, ενώ τα 4 δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL.





Σχήμα 8: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης στα δείγματα αίματος



γ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 2-προπανόλης.

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης στα δείγματα του αίματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 9. Από τα 149 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 10,0$ mg/dL, τα 140 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2προπ} < 0,10$ mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα εννέα δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 1,00 mg/dL.

Από τα 15 δείγματα αίματος που η $C_{αιθ}$ κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, τα 8 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL. Τα 6/15 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 1,00 mg/dL, ενώ το 1/15 δείγματα είχε $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 10,0 mg/dL.

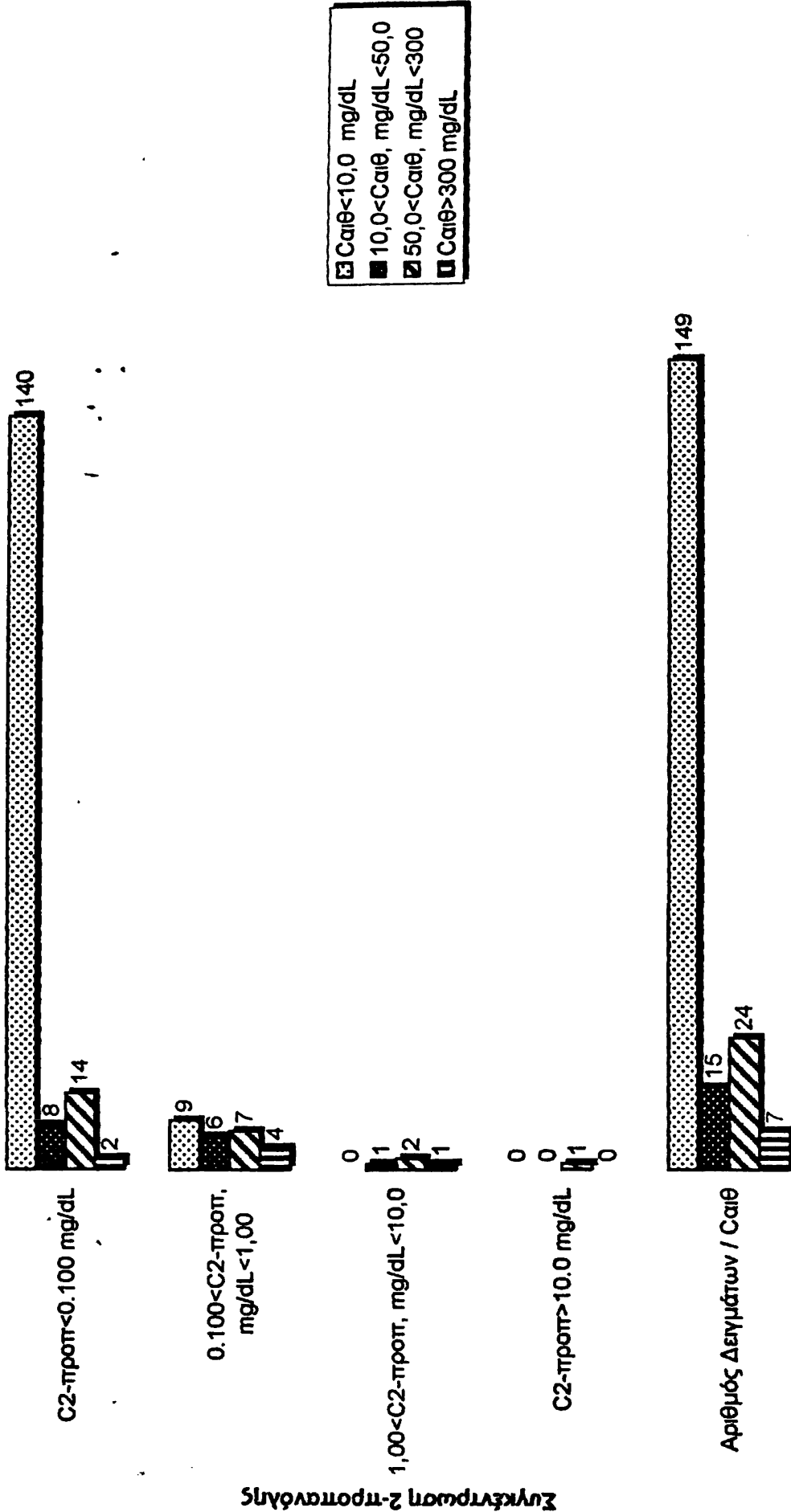
Από τα 24 δείγματα αίματος που η $C_{αιθ}$ κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, τα 14 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL. Τα 7/24 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 1,00 mg/dL, τα 2/24 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 10,0 mg/dL, ενώ το 1/24 δείγματα είχε $C_{2προπ}$ που ήταν $> 10,0$ mg/dL.

Από τα 7 δείγματα αίματος που η $C_{αιθ}$ ήταν > 300 mg/dL, τα 2 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL. Τα 4/7 δείγματα είχαν $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 1,00 mg/dL, ενώ το 1/7 δείγματα είχε $C_{2προπ}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 10,0 mg/dL.

δ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της ακετόνης.

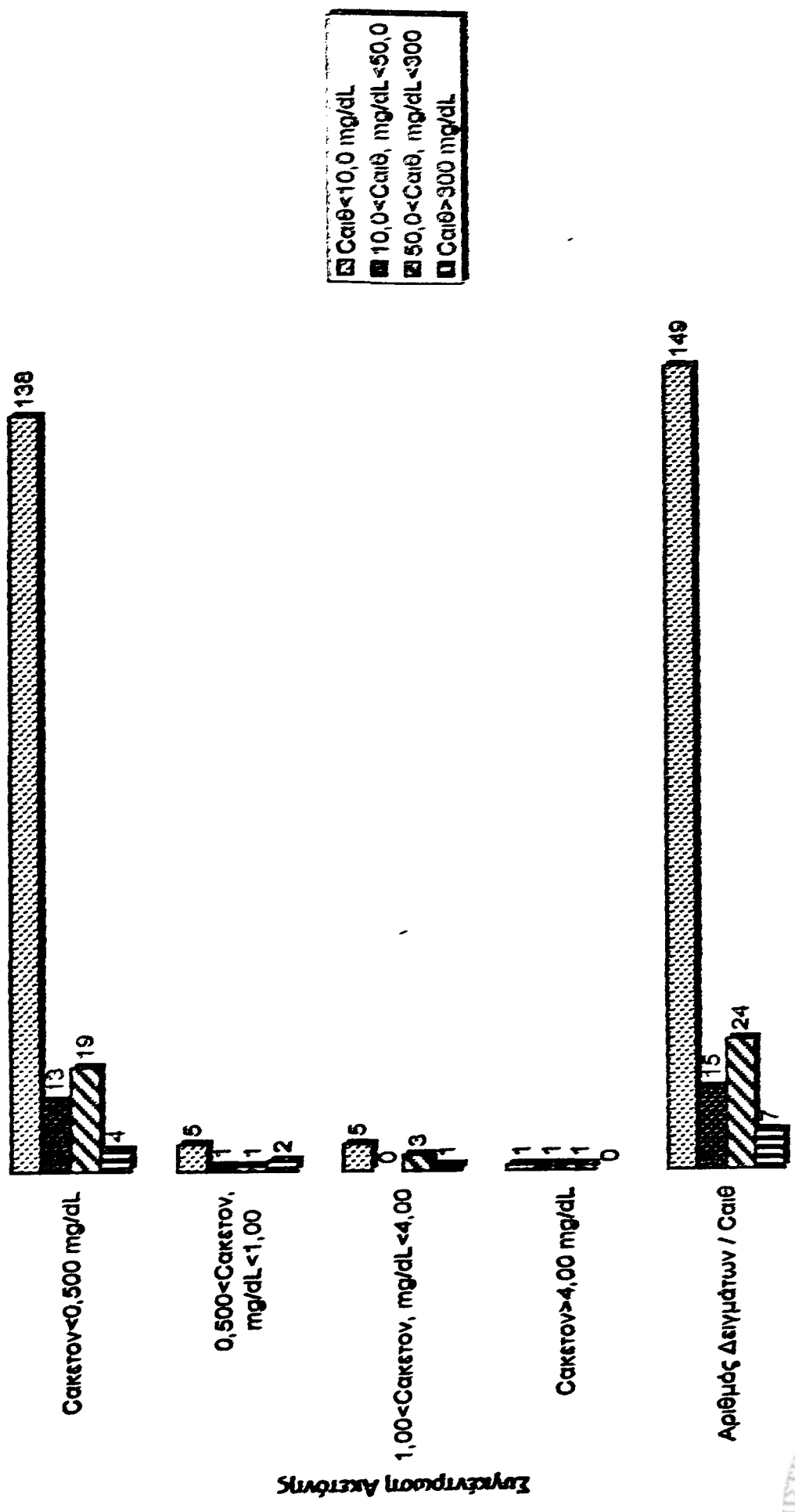
Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακετόνης στα δείγματα του αίματος που μελετήθηκαν παρουσιάζεται στο Σχήμα 10. Από τα 149 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 10,0$ mg/dL, τα 138 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{ακετον} < 0,50$ mg/dL, τα 5/149 δείγματα είχαν $C_{ακετον}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL,





Σχήμα 9: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 2-προπανάλης στα δείγματα αίματος





Αριθμός Δειγμάτων

Σχήμα 10: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακετόνης στα δείγματα αίματος



τα 5/149 δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 4,00 mg/dL και 1/149 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $> 4,00$ mg/dL.

Από τα 15 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, τα 13 δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $< 0,50$ mg/dL, το 1/15 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL και τέλος το 1/15 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $> 4,00$ mg/dL.

Από τα 24 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, τα 19 δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $< 0,50$ mg/dL, το 1/24 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL, τα 3/24 δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 4,00 mg/dL, ενώ το 1/24 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $> 4,00$ mg/dL.

Από τα 7 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ ήταν ≥ 300 mg/dL, τα τέσσερα δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που ήταν $< 0,50$ mg/dL. Τα 2/7 δείγματα είχαν $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 0,50 mg/dL ως 1,00 mg/dL, ενώ το 1/7 δείγματα είχε $C_{\text{ακετον}}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 4,00 mg/dL.

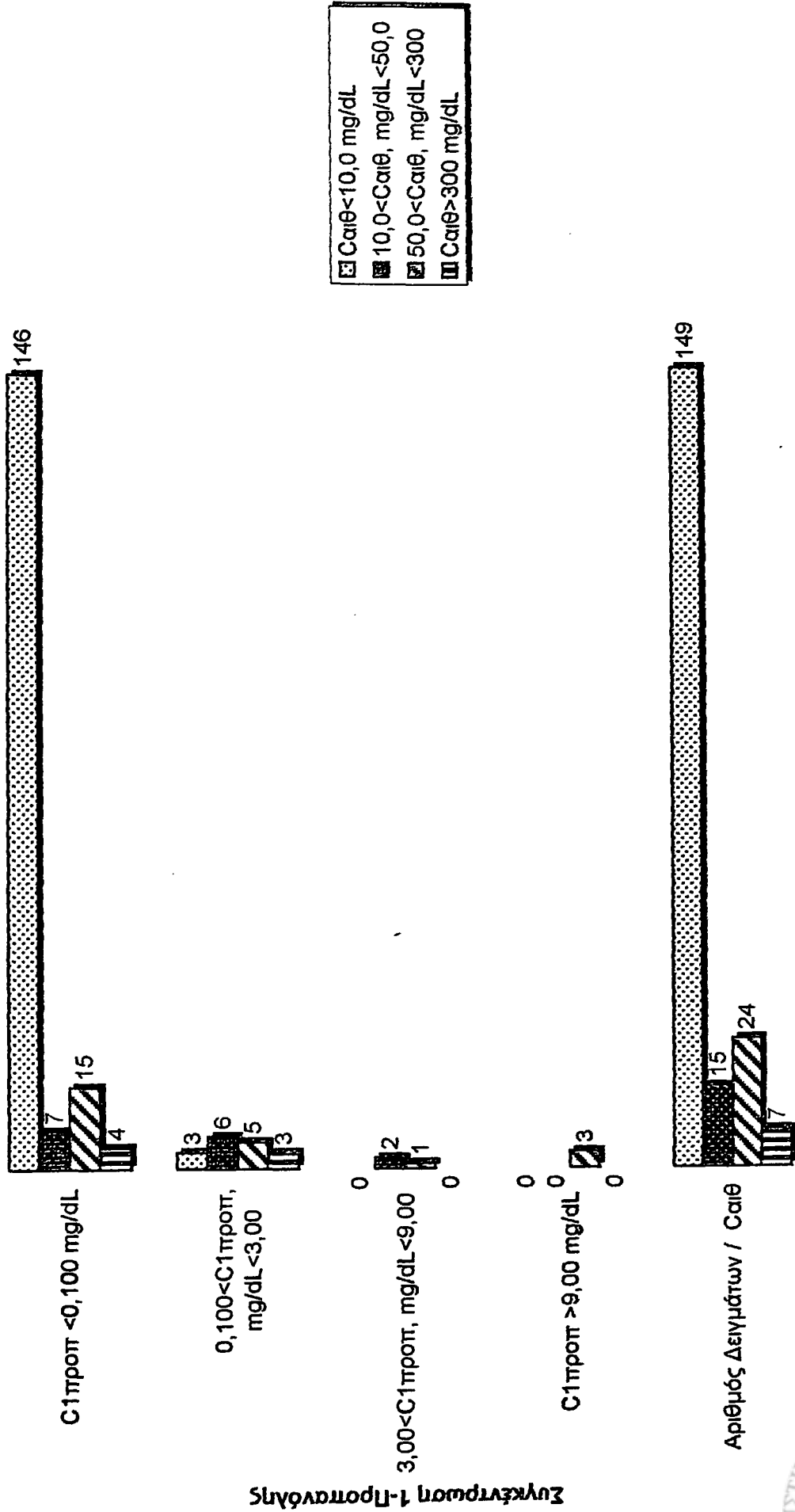
ε. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 1-προπανόλης.

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στα δείγματα του αίματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 11. Από τα 149 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{\text{αιθ}} < 10,0$ mg/dL, τα 146 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλη $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα τρία δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL.

Από τα 15 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, τα 7 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL, τα 6/15 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL, ενώ τα 2/15 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL.

Από τα 24 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, τα 15 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL. Τα 5/24 δείγματα





Αριθμός Δειγμάτων

Σχήμα 11: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της C1πρωτ στα δείγματα αίματος



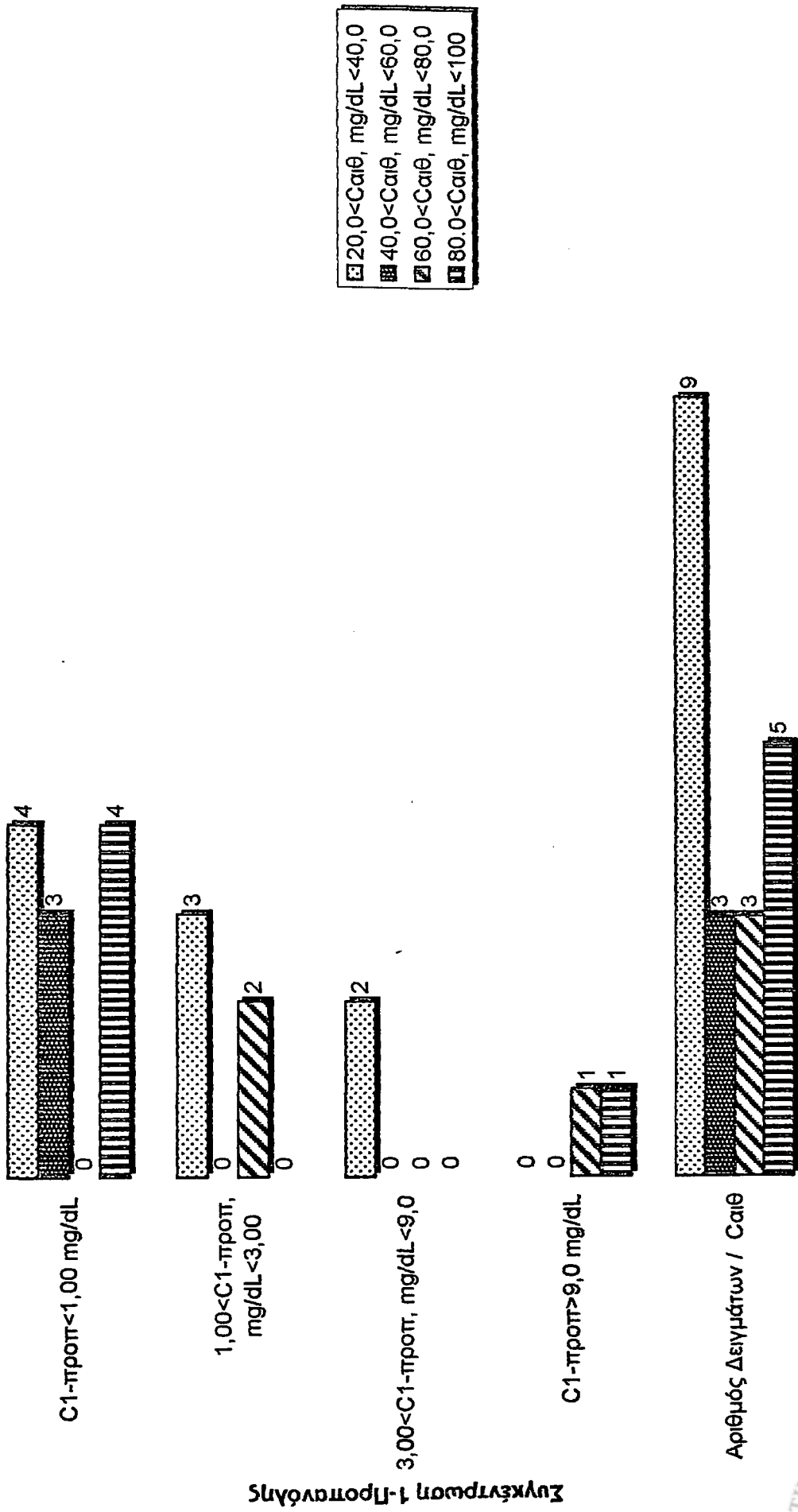
είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL, το 1/24 δείγματα είχε $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL, ενώ τα 3/24 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που ήταν $> 9,00$ mg/dL.

Από τα 7 δείγματα αίματος που η $C_{\text{αιθ}}$ ήταν > 300 mg/dL, τα 4 δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που ήταν $< 0,10$ mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα τρία δείγματα είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL.

Λόγω της συσχέτισης της αιθανόλης με την 1-προπανόλη πραγματοποιήθηκε επιμέρους συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους στο εύρος των συγκεντρώσεων της αιθανόλης 20,0-100 mg/dL, στο οποίο αφενός συμπεριλαμβάνονται δείγματα με «ένοχες» συγκεντρώσεις αιθανόλης ($> 50,0$ mg/dL) και αφετέρου η αιθανόλη (στο εύρος αυτό) έχει αποδοθεί σε μεταθανάτια παραγωγή (Corry 1978, O'Neal 1996a). Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, σε σύνολο 20 δειγμάτων αίματος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 12.

Στα 5/20 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 80,0 mg/dL $\leq C_{\text{αιθ}} < 100$ mg/dL. Στα 4/5 η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $< 0,10$ mg/dL, ενώ σε 1/5 δείγματα η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $> 9,00$ mg/dL (20%). Στα 3/20 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 60,0 mg/dL $\leq C_{\text{αιθ}} < 80,0$ mg/dL. Στα 2/3 η συγκέντρωση της 1-προπανόλης κυμαίνονταν στο εύρος 0,10 mg/dL $\leq C_{1\text{προπ}} < 3,00$ mg/dL, ενώ σε 1/3 δείγματα η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $> 9,00$ mg/dL (33%). Στα 3/20 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 40,0 mg/dL $\leq C_{\text{αιθ}} < 60,0$ mg/dL. Στα 3/3 η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $< 0,10$ mg/dL. Στα 9/20 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 20,0 mg/dL $\leq C_{\text{αιθ}} < 40,0$ mg/dL. Στα 4/9 η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $< 0,10$ mg/dL, στα 3/9 κυμαίνονταν στο εύρος 0,10 mg/dL $\leq C_{1\text{προπ}} < 3,00$ mg/dL, ενώ στα 2/9 δείγματα η συγκέντρωσή της κυμαίνονταν στο εύρος 3,00 mg/dL $\leq C_{1\text{προπ}} < 9,00$ mg/dL (22%).





Αριθμός Δειγμάτων

Σχήμα 12: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της 1-προπανάλης στα δείγματα αίματος με συγκεντρώσεις αιθανόλης από 20,0-100 mg/dL



Συγκέντρωση 1-Προπανάλης

στ. Συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ακεταλδεϋδης και της 2-προπανόλης με τις σηπτικές εξεργασίες.

Η πλειοψηφία των δειγμάτων αίματος που είχαν πολύ μικρή συγκέντρωση 1-προπανόλης ($< 0,10 \text{ mg/dL}$) (29/172) ή μη ανιχνεύσιμη (143/172), είχαν επίπεδα αιθανόλης που εκτείνονταν σε όλα τα εύρη των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν. Στα δείγματα που η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν $> 0,10 \text{ mg/dL}$ ήταν πιθανό η παρουσία της να αποτελεί δείκτη ύπαρξης μικροβιακού φορτίου με συνέπεια, στα δείγματα αυτά να έχει λάβει χώρα, σε κάποιο βαθμό, μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης.

Αποφασίστηκε να διερευνηθεί η πιθανότητα συσχέτισης των επιπέδων της αιθανόλης στα δείγματα αίματος με συγκέντρωση $10,0 \text{ mg/dL} \leq C_{\text{αιθ}} < 300 \text{ mg/dL}$ με τα επίπεδα της 1-προπανόλης και των άλλων πτητικών που προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε αυτά.

Τα 8/15 δείγματα με $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από $10,0 \text{ mg/dL}$ ως $50,0 \text{ mg/dL}$ είχαν και $C_{1\text{προπ}} > 0,10 \text{ mg/dL}$. Πιο συγκεκριμένα, τα 6/8 είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $0,10 \text{ mg/dL}$ ως $3,00 \text{ mg/dL}$ και τα 2/8 είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $3,00 \text{ mg/dL}$ ως $9,00 \text{ mg/dL}$. Για τα 6/8 δείγματα, με $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $0,10 \text{ mg/dL}$ ως $3,00 \text{ mg/dL}$, βρέθηκε ότι τα 2/6 είχαν και $C_{\text{ακεταλ}} > 1,00 \text{ mg/dL}$, ενώ το 1/6 είχε $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από $0,50 \text{ mg/dL}$ ως $1,00 \text{ mg/dL}$. Συγχρόνως τα 4/6 δείγματα είχαν $C_{2\text{προπ}}$ που ήταν $> 0,10 \text{ mg/dL}$. Για τα 2/8 δείγματα που είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $3,00 \text{ mg/dL}$ ως $9,00 \text{ mg/dL}$, βρέθηκε ότι και τα δύο δείγματα είχαν $C_{\text{ακεταλ}}$ που κυμαίνονταν από $0,50 \text{ mg/dL}$ ως $1,00 \text{ mg/dL}$ και $C_{2\text{προπ}}$ που ήταν $> 0,10 \text{ mg/dL}$.

Από τα 9/24 δείγματα που είχαν $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από $50,0 \text{ mg/dL}$ ως 300 mg/dL και $C_{1\text{προπ}} > 0,10 \text{ mg/dL}$, τα 5/9 είχαν παράλληλα $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $0,10 \text{ mg/dL}$ ως $3,00 \text{ mg/dL}$, το 1/9 είχε παράλληλα $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $3,00 \text{ mg/dL}$ ως $9,00 \text{ mg/dL}$, ενώ τα 3/9 δείγματα είχαν παράλληλα $C_{1\text{προπ}} > 9,00 \text{ mg/dL}$. Τα 5/9 παραπάνω δείγματα είχαν παράλληλα και $C_{\text{ακεταλ}} > 1,00 \text{ mg/dL}$. Όσον αφορά στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης στα παραπάνω δείγματα, τα 3/9 είχαν $C_{2\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από $0,10 \text{ mg/dL}$ ως



1,00 mg/dL, το 1/9 είχε $C_{2\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 1,00 mg/dL ως 10,0 mg/dL και 1/9 είχε $C_{2\text{προπ}}$ που ήταν $> 10,0$ mg/dL.

Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 1-προπανόλης, της ακεταλδεϋδης και της 2-προπανόλης στα 8/15 δείγματα όπου η $C_{\text{αιθ}}$ κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL και η $C_{1\text{προπ}}$ ήταν $> 0,10$ mg/dL. Από το Σχήμα 13 προκύπτει ότι τα 2/2 δείγματα που είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL είχαν παράλληλα και υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης (Δείγματα 7 και 8). Τα 2/6 δείγματα που είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL είχαν επίσης και υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης (Δείγματα 3 και 4).

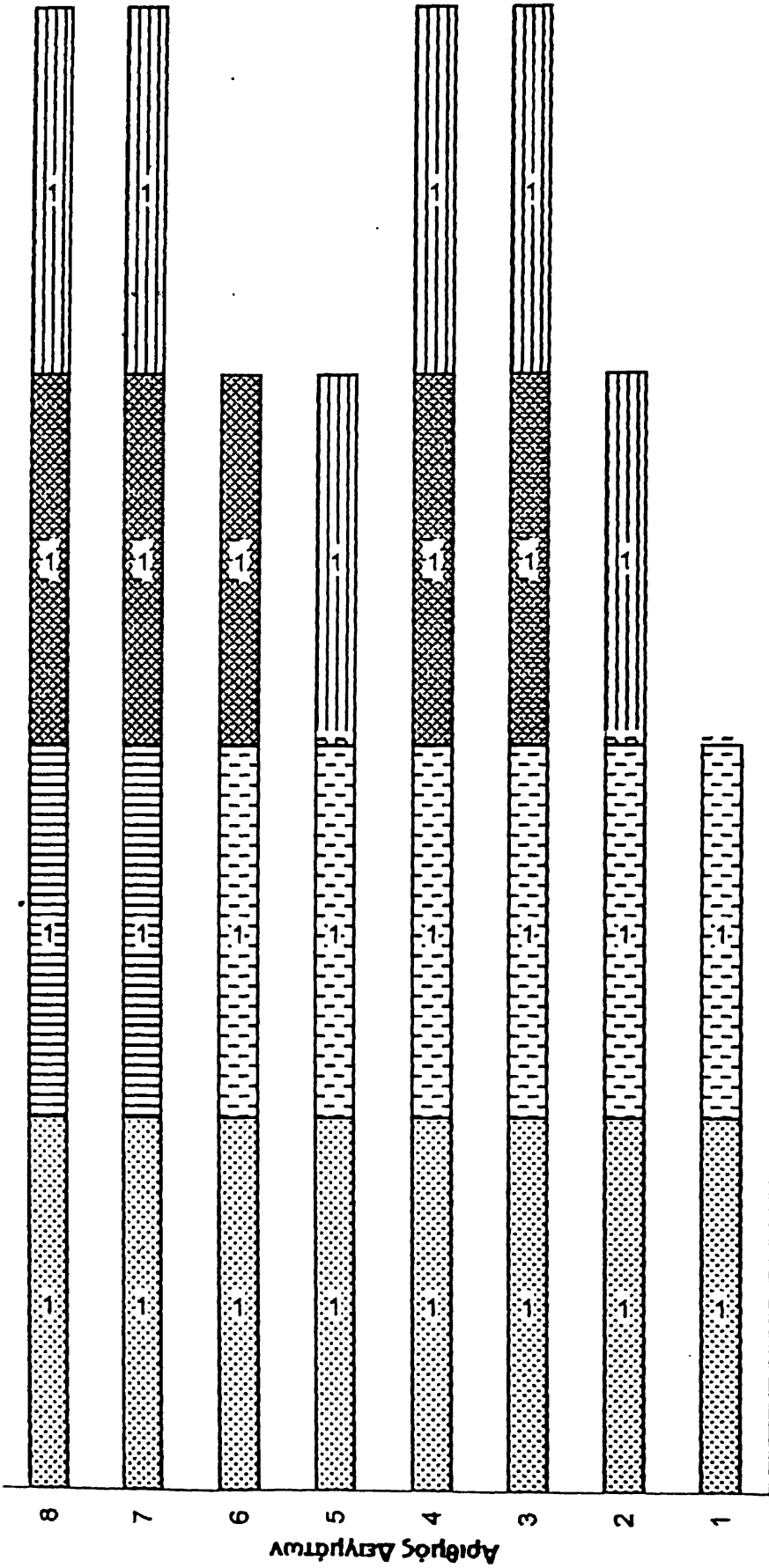
Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα της 1-προπανόλης, της ακεταλδεϋδης και της 2-προπανόλης στα 9/24 δείγματα αίματος που είχαν $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL και η $C_{1\text{προπ}}$ ήταν $> 0,10$ mg/dL. Από το Σχήμα 14 προκύπτει ότι τα 2/3 δείγματα που είχαν $C_{1\text{προπ}}$ που ήταν $> 9,00$ mg/dL, είχαν παράλληλα και υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης (Δείγματα 8 και 9). Το ένα δείγμα με $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL είχε και αυτό υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης (Δείγμα 6), ενώ μόνο το 1/5 δείγματα που είχε $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL είχε ταυτόχρονα και υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης (Δείγμα 5).

Η ανασκόπηση των Ιατροδικαστικών εκθέσεων για τα αντίστοιχα περιστατικά επιβεβαίωσε ότι τα 4/8 δείγματα αίματος του Σχήματος 13 (Δείγματα 3, 4, 7 και 8) και τα 4/9 δείγματα αίματος του Σχήματος 14 (Δείγματα 5, 6, 8 και 9) προέρχονταν από πτώματα στα οποία βρισκονταν σε εξέλιξη σηπτικές εξεργασίες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Το 84,1% των δειγμάτων αίματος είχε συγκέντρωση αιθανόλης $< 50,0$ mg/dL.
- Από το 76,4% των δειγμάτων αίματος που είχε συγκέντρωση αιθανόλης $< 10,0$ mg/dL, είχε παράλληλα πολύ μικρή ή μη ανιχνεύσιμη ποσότητα





$10,0 < Ca_{iθ}, mg/dL < 50,0$

 $0,100 < C1-προπρ, mg/dL < 3,00$

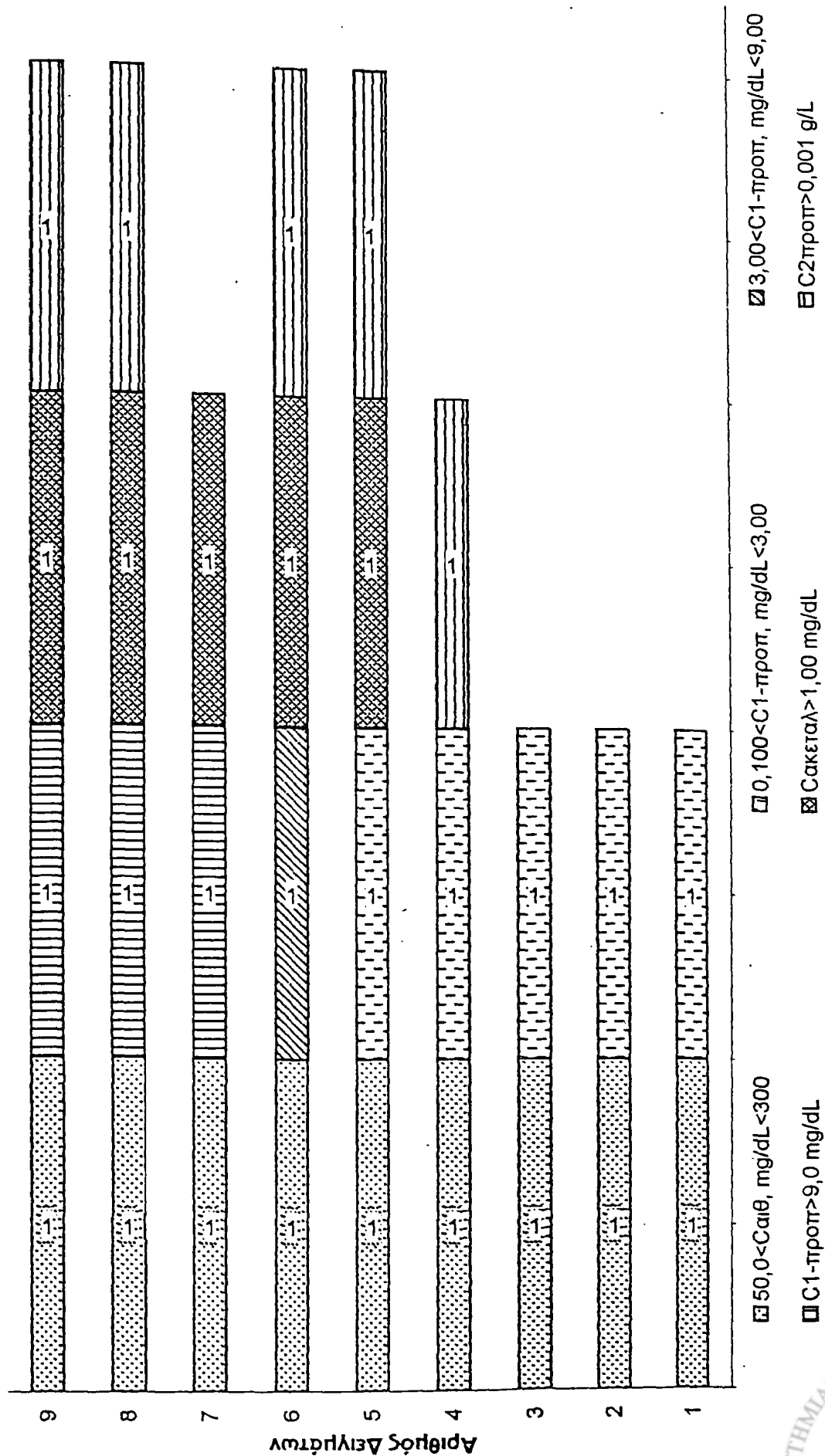
 $3,00 < C1-προπρ, mg/dL < 9,00$

 $Ca_{κεταλ} > 0,500 mg/dL$

 $0,100 < C2-προπρ, mg/dL < 1,00$

Σχήμα 13: Δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης από 10,0-50,0 mg/dL, συγκέντρωση 1-προπανόλης και 2-προπανόλης >0,100 mg/dL αντίστοιχα, και συγκέντρωση ακεταλδεύδης >0,5 mg/dL.





Σχήμα 14: Δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης από 50,0-300 mg/dL, συγκέντρωση 1-προπανόλης και 2-προπανόλης >0,1 mg/dL αντίστοιχα, και συγκέντρωση ακεταλδεύδης >0,5 mg/dL.



ακεταλδεϋδης το 98%, 1-προπανόλης το 98%, 2-προπανόλη το 94% και ακετόνης το 93%.

- Στο 23,6% των δειγμάτων αίματος που είχε συγκέντρωση αιθανόλης > 10,0 mg/dL ανιχνεύτηκαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις των πτητικών ακεταλδεϋδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη και ακετόνη.
- Ο προσδιορισμός σε δείγματα αίματος συγκεντρώσεων ακεταλδεϋδης > 0,50 mg/dL, 1-προπανόλης > 0,10 mg/dL και 2-προπανόλης > 0,10 mg/dL, το καθιστά «ύποπτο» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης (συγκεντρώσεις πτητικών «ενδεικτικές» μικροβιακής δραστηριότητας).
- Ποσοστό 21% των δειγμάτων αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης από 10,0 mg/dL ως 300 mg/dL, χαρακτηρίστηκαν «ύποπτα» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης.

3.2.2. Προσδιορισμός πτητικών σε άλλα βιολογικά υλικά.

Το αίμα είναι το βιολογικό υλικό που έχει καθοριστεί από το νόμο να αναλύεται για τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Το αίμα όμως, δεν είναι πάντα διαθέσιμο ιδιαίτερα όταν πρόκειται για πτώματα σε σήψη. Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία άλλων βιολογικών υλικών που θα επιτρέπει τον προσδιορισμό της αιθανόλης όπως τα ούρα, το υαλοειδές υγρό κτλ. Επίσης, για τον προσδιορισμό της προέλευσης της αιθανόλης στο αναλυόμενο υλικό (κατάποση από το άτομο "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή) θα πρέπει να πραγματοποιείται δειγματοληψία διαφορετικών βιολογικών υλικών από το ίδιο πτώμα (αίμα, ούρα, υαλοειδές υγρό κτλ). Η εύρεση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης στους ιστούς του πτώματος (παρουσία αιθανόλης στο αίμα και απουσία σε άλλα βιολογικά υλικά ή μεγάλες διακυμάνσεις στις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις από ιστό σε ιστό) αποτελεί ένδειξη μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης (Lewis 2004).

Αναλύθηκαν 48 δείγματα ούρων που ελήφθησαν από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης που μετρήθηκαν στα 48 δείγματα των ούρων κυμάνθηκαν από 0,08



mg/dL ως 529 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από 0,00 mg/dL ως 0,55 mg/dL, της 1-προπανόλης από 0,00 mg/dL ως 0,73 mg/dL, της 2-προπανόλης από 0,00 mg/dL ως 1,33 mg/dL και της ακετόνης από 0,01 mg/dL ως 10,4 mg/dL.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων ούρων κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία, βρέθηκαν: 0/48 δείγματα για την αιθανόλη, 21/48 δείγματα για την ακεταλδεΐδη, 26/48 δείγματα για την 1-προπανόλη, 5/48 δείγματα για την 2-προπανόλη και τέλος, 0/48 δείγματα για την ακετόνη.

Κατά την ανάλυση των 48 δειγμάτων ούρων ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Η κατάταξη των δειγμάτων ούρων έγινε σε τέσσερις ομάδες, όπως καθορίστηκαν για το αίμα, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της αιθανόλης. Στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα ούρων με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} \geq 300$ mg/dL, στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα ούρων με συγκέντρωση αιθανόλης $50,0$ mg/dL $\leq C_{αιθ} < 300$ mg/dL, στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης $10,0$ mg/dL $\leq C_{αιθ} < 50,0$ mg/dL και τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 10,0$ mg/dL. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων ούρων σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.

Βρέθηκαν 6/48 δείγματα (12,5%) με $C_{αιθ} \geq 300$ mg/dL (ομάδα Α), 5/48 (10,4%) με συγκέντρωση αιθανόλης $50,0$ mg/dL $\leq C_{αιθ} < 300$ mg/dL (ομάδα Β), 2/48 δείγματα (4,2%) με συγκέντρωση αιθανόλης $10,0$ mg/dL $\leq C_{αιθ} < 50,0$ mg/dL (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 35/48 δείγματα (72,9%) με συγκέντρωση αιθανόλης $< 10,0$ mg/dL (ομάδα Δ).

Τα δείγματα ούρων κατατάχτηκαν στις τέσσερις ομάδες συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης που καθορίστηκαν για το αίμα ως εξής: στην ομάδα Α κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1προπ} \geq 9,00$ mg/dL, στην ομάδα Β κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $3,00$ mg/dL $\leq C_{1προπ} < 9,00$ mg/dL, στην ομάδα Γ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $0,10$ mg/dL $\leq C_{1προπ} < 3,00$ mg/dL, και τέλος στην



ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ουσιών στα ούρα.

Πτητικές ουσίες	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό (%)
Αμμωνία	48	100
Βουτανόνη	37	77
Οξικός αιθυλεστέρας	14	29
2-βουτανόλη	11	23
1-βουτανόλη	3	6,3
Μεθανόλη	1	2,1



ΠΙΝΑΚΑΣ 9

Κατάταξη των δειγμάτων ούρων σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Ομάδες	Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/dl)	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{αιθ} \geq 300$	6	12,5
B	$50,0 \leq C_{αιθ} < 300$	5	10,4
Γ	$10,0 \leq C_{αιθ} < 50,0$	2	4,2
Δ	$C_{αιθ} < 10,00$	35	72,9



ομάδα Δ κατατάχτηκαν τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των δειγμάτων ούρων σύμφωνα με την προηγούμενη κατάταξη.

Βρέθηκαν 0/48 δείγματα (0%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} \geq 9,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Α), 0/48 δείγματα (0%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $3,00 \text{ mg/dL} \leq C_{1\text{προπ}} < 9,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Β), 15/48 δείγματα (33,3%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $0,10 \text{ mg/dL} \leq C_{1\text{προπ}} < 3,00 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Γ) και τέλος, βρέθηκαν 33/48 δείγματα (68,7%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης $< 0,10 \text{ mg/dL}$ (ομάδα Δ).

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στα δείγματα ούρων και οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης που προσδιορίστηκαν στα αντίστοιχα δείγματα αίματος.

Από τον Πίνακα 11 προκύπτει ότι από τα 6/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{\text{αιθ}} \geq 300 \text{ mg/dL}$, τα τρία είχαν παράλληλα και στο αίμα $C_{\text{αιθ}} \geq 300 \text{ mg/dL}$, ενώ τα υπόλοιπα τρία είχαν $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL. Από τα 5/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, το ένα είχε στο αίμα $C_{\text{αιθ}} \geq 300 \text{ mg/dL}$, ενώ τα τέσσερα είχαν παράλληλα και στο αίμα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL. Από τα 2/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, το ένα είχε στο αίμα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, ενώ το άλλο είχε παράλληλα και στο αίμα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL. Τέλος, τα 35/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{\text{αιθ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$, το ένα είχε στο αίμα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 50,0 mg/dL ως 300 mg/dL, ένα ακόμα είχε στο αίμα $C_{\text{αιθ}}$ που κυμαίνονταν από 10,0 mg/dL ως 50,0 mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα 33 είχαν παράλληλα και στο αίμα $C_{\text{αιθ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι: στα περιστατικά που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη στα ούρα από ότι στο αντίστοιχο δείγμα αίματος (3/48), η αιθανόλη βρισκόταν, κατά τη στιγμή του θανάτου, στο στάδιο της απέκκρισης. Στα περιστατικά που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μικρότερη στα ούρα από ότι στο αντίστοιχο δείγμα αίματος (5/48), η αιθανόλη βρισκόταν,



ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Κατάταξη των δειγμάτων ούρων σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης.

Ομάδες	Συγκέντρωση 1-προπανόλης ($C_{1\text{προπ}}$) mg/dL	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό δειγμάτων (%)
A	$C_{1\text{προπ}} \geq 9,00$	0	0
B	$3,00 \leq C_{1\text{προπ}} < 9,00$	0	0
Γ	$0,10 \leq C_{1\text{προπ}} < 3,00$	15	31,3
Δ	$C_{1\text{προπ}} < 0,10$	33	68,7



ΠΙΝΑΚΑΣ 11

Σύγκριση επιπέδων αιθανόλης σε δείγματα ούρων και αίματος
του ίδιου περιστατικού.

Ομάδες	Αριθμός δειγμάτων ούρων	Ομάδες στα αντίστοιχα δείγματα αίματος	
Α	6	3	Α
		3	Β
Β	5	1	Α
		4	Β
Γ	2	1	Β
		1	Γ
Δ	35	1	Β
		1	Γ
		33	Δ



κατά τη στιγμή του θανάτου, στο στάδιο της απορρόφησης. Τέλος, τα 33/35 περιστατικά (94%) που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης στα ούρα $< 10,0$ mg/dL, είχαν και συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα $< 10,0$ mg/dL.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται η κατάσταση των δειγμάτων ούρων με βάση τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στα αντίστοιχα δειγμάτων αίματος.

Από τον Πίνακα 12 προκύπτει ότι από τα 15/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL τα δύο είχαν παράλληλα και στο αίμα $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα 13 είχαν $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL. Από τα 33/48 περιστατικά που είχαν στα ούρα $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL το ένα είχε στο αίμα $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL, το ένα είχε $C_{1\text{προπ}}$ που κυμαίνονταν από 0,10 mg/dL ως 3,00 mg/dL, ενώ τα υπόλοιπα 31 είχαν παράλληλα και στο αίμα $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL.

Η παρουσία 1-προπανόλης καταγράφηκε και στα ούρα, σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις από ότι στο αίμα ($< 3,00$ mg/dL). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, στα 13/15 περιστατικά που η συγκέντρωση της 1-προπανόλης στα δείγματα ούρων κυμαίνονταν στο εύρος των συγκεντρώσεων 0,10 mg/dL-3,00 mg/dL, στα αντίστοιχα δείγματα αίματος ήταν μικρότερη ($< 0,10$ mg/dL). Το 1/33 περιστατικά είχε υψηλή συγκέντρωση 1-προπανόλης (3,00 mg/dL ως 9,00 mg/dL) στο αίμα και πολύ χαμηλή στα ούρα ($< 0,10$ mg/dL). Η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 34,8 mg/dL και 0,15 mg/dL στο αίμα και στα ούρα αντίστοιχα, του ίδιου περιστατικού. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι στο συγκεκριμένο δείγμα είναι πιθανό να υπάρχει μικροβιακή δραστηριότητα.

Η μεταθανάτια κατανομή της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά μελετήθηκε σε 12 περιστατικά αντίστοιχου αριθμού πτωμάτων. Στο Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των υλικών που ελήφθησαν, ανά περιστατικό, για τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης.

Από τον Πίνακα 13 προκύπτει ότι στα 3/8 δείγματα στομαχικού περιεχομένου, που αναλύθηκαν, τα επίπεδα της αιθανόλης παρουσιάζονταν αυξημένα σε σχέση με τα υπόλοιπα βιολογικά υλικά (περιστατικό 7, 8 και 10),



ΠΙΝΑΚΑΣ 12

Σύγκριση επιπέδων 1-προπανόλης σε δείγματα ούρων και αίματος του ίδιου περιστατικού.

Ομάδες	Αριθμός δειγμάτων ούρων	Ομάδες στα αντίστοιχα δείγματα αίματος	
Γ	15	2	Γ
		13	Δ
Δ	33	1	Β
		1	Γ
		31	Δ



ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Επίπεδα αιθανόλης και 1-προπανόλης σε βιολογικά υλικά
του ίδιου περιστατικού.

α/α	Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/dL)					Συγκέντρωση 1-προπανόλης (mg/dL)				
	Αίμα	Ούρα	Υ.υ.	Χολή	Στ.π*	Αίμα	Ούρα	Υ.υ.	Χολή	Στ.π*
1	324	349	-	-	357	0,09	0,50	-	-	0,93
2	81,7	-	-	-	47,4	10,4	-	-	-	0,80
3	2,85	3,28	0,92	4,97	-	0,00	0,18	0,00	0,35	-
4	1,23	1,10	4,50	0,44	-	0,00	0,20	0,09	0,00	-
5	0,81	1,50	-	-	2,06	0,00	0,06	-	-	0,08
6	0,39	0,62	-	-	1,48	0,00	0,00	-	-	0,00
7	0,20	0,80	-	-	11,1	0,00	0,01	-	-	0,42
8	0,17	-	-	-	53,6	0,00	-	-	-	0,31
9	0,14	-	-	-	0,14	0,00	-	-	-	0,00
10	0,11	0,38	-	-	57,5	0,00	0,00	-	-	0,01
11	0,10	0,48	0,12	0,12	-	0,00	0,00	0,00	0,00	-
12	0,07	0,58	0,00	-	1,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00

Υ.υ. : Υαλοειδές υγρό

Στ.π.: Στομαχικό περιεχόμενο

*Στο δείγμα 12 είναι Περικάρδιο Υγρό



ενώ στο 1/8 η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μειωμένη σε σχέση με τη συγκέντρωσή της στο αντίστοιχο δείγμα αίματος (περιστατικό 2). Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά των υπολοίπων περιστατικών δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Η 1-προπανόλη ανιχνεύτηκε σε όλα τα είδη των βιολογικών υλικών (εκτός του περικαρδίου υγρού) ακόμα και σε περιστατικά που η συγκέντρωσή της στο αίμα ήταν μηδενική (περιστατικό 3, 4, 5, 7, 8, 10).

Στα δείγματα στομαχικού περιεχομένου οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκαν από 0,01 mg/dL ως 2,30 mg/dL, της 2-προπανόλης από 0,00 mg/dL ως 0,42 mg/dL και της ακετόνης από 0,03 mg/dL ως 1,06 mg/dL. Στα δείγματα υαλοειδούς υγρού οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκαν από 0,02 mg/dL ως 0,04 mg/dL, της 2-προπανόλης από 0,00 mg/dL ως 1,15 mg/dL και της ακετόνης από 0,05 mg/dL ως 5,13 mg/dL. Στα δείγματα χολής οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκαν από 0,03 mg/dL ως 0,13 mg/dL, της 2-προπανόλης από 0,05 mg/dL ως 3,23 mg/dL και της ακετόνης από 0,04 mg/dL ως 1,28 mg/dL. Στο δείγμα περικαρδίου υγρού η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης ήταν 0,00 mg/dL, της 2-προπανόλης ήταν 0,16 mg/dL και της ακετόνης 0,38 mg/dL.

Οι συγκεντρώσεις των πτητικών ουσιών κατά την ανάλυση των δύο δειγμάτων ήπατος ήταν μηδενικές.

Κατά την ανάλυση των πτωματικών δειγμάτων του υαλοειδούς υγρού, της χολής, του στομαχικού περιεχομένου, του περικαρδίου υγρού και του ήπατος ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Κατά την ανάλυση των βιολογικών υλικών τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Τα επίπεδα της αιθανόλης μπορεί να ποικίλουν στα διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος και οι μεγαλύτερες διαφορές στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης παρατηρούνται μεταξύ αίματος και ούρων και μεταξύ αίματος και στομαχικού περιεχομένου.
- Τα επίπεδα της 1-προπανόλης παρουσιάζουν επίσης διακυμάνσεις στα διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος, συνήθως εμφανίζονται



ΠΙΝΑΚΑΣ 14

Πτητικές ουσίες που ανιχνεύτηκαν ποιοτικά στο υαλοειδές υγρό, στη χολή, στο στομαχικό περιεχόμενο, στο περικάρδιο υγρό και στο ήπαρ.

Πτητικές ουσίες	Υ.υ.	Χολή	Στ.π.	Π.υ.	Ήπαρ
Αμμωνία	+	+	+	+	+
Οξικός αιθυλεστέρας	-	+	+	-	+
Μεθανόλη	-	+	-	-	-
Βουτανόνη	+	+	+	-	+
2-βουτανόλη	-	+	+	-	+
1-βουτανόλη	-	+	+	-	+
Ισοαμλική Αλκοόλη	-	-	+	-	-

Υ.υ. : Υαλοειδές υγρό

Στ.π.: Στομαχικό περιεχόμενο

Π.υ. : Περικάρδιο υγρό



αυξημένα στα ούρα και το στομαχικό περιεχόμενο σε σχέση με το αίμα αν και διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα. Οι διακυμάνσεις αυτές είναι πιθανό να οφείλονται σε μικροβιακή δραστηριότητα "εν ζωή" είτε να είναι αποτέλεσμα των σηπτικών εξεργασιών.

- Σε όλα τα είδη των βιολογικών υλικών ανιχνεύτηκε ακεταλδεϋδη, 2-προπανόλη και ακετόνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ αμμωνία, οξικός αιθυλεστέρας, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη και βουτανόνη ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα από αυτά.



3.3. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών των βιολογικών υλικών.

Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης υφίσταται ποικίλες μεταβολές κατά την αποθήκευση των βιολογικών υλικών που προέρχονται από πτώματα (Corry 1978, Garriott 2003). Τα βιολογικά υλικά που αποστέλλονται για τοξικολογική ανάλυση είναι το αίμα (κυρίως) και τα ούρα (δευτερευόντως), τα οποία κατά κανόνα αποθηκεύονται σε σωληνάρια αιμοληψίας και πλαστικά σωληνάρια αντίστοιχα, χωρίς συντηρητικό, στους 4°C. Σύμφωνα με τη νομοθεσία τα δείγματα που αποστέλλονται για τοξικολογική ανάλυση στα αντίστοιχα εργαστήρια πρέπει να αποθηκευτούν, υπό ψύξη, για χρονικό διάστημα τριών μηνών (90 ημέρες) για την περίπτωση που χρειάζεται επανεξέταση αυτών. Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις στην χώρα μας, τα δείγματα που λαμβάνονται κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, μεταφέρονται για ανάλυση σε εργαστήρια που βρίσκονται μακριά από τον τόπο της νεκροτομής και δειγματοληψίας, και με αυτόν τον τρόπο είναι πιθανή η έκθεσή τους σε υψηλότερες θερμοκρασίες (από τους 4°C) για αρκετές ημέρες.

Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης δειγμάτων αίματος και ούρων, που ελήφθησαν από πτώματα, στα επίπεδα της αιθανόλης, καθώς και των άλλων πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν στα βιολογικά υλικά. Σκοπός της μελέτης ήταν, αφενός η εύρεση του «ασφαλούς» χρονικού ορίου αποθήκευσης στους 4°C (όπου η μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μη σημαντική), και αφετέρου η διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας περιβάλλοντος στη συγκέντρωση της αιθανόλης που προσδιορίζεται στο αίμα και στα ούρα.



3.3.1. Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά κατά την επώαση στους 4°C.

α. Αίμα

Επιλέχθηκαν 10 δείγματα αίματος από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, που ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκαν στους 4°C για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με κριτήριο την αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις να ανταποκρίνονται σε όλο το εύρος των μετρηθέντων συγκεντρώσεων αιθανόλης στο αίμα (0,62 mg/dL - 555 mg/dL). Την 0^η, 10^η, 20^η, 40^η, 60^η και 90^η ημέρα της επώασης των δειγμάτων αντίστοιχα, μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης παρουσίαζε μη σημαντικές μεταβολές μέχρι την 20^η ημέρα της επώασης στους 4°C ενώ από την 40^η ημέρα της επώασης και μετά, παρουσίαζε σημαντικές μεταβολές.

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών που μετρήθηκαν την 40^η ημέρα της επώασης στους 4°C (εκατοστιαία μεταβολή από την αρχική τιμή).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα 4/10 δείγματα αίματος παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (δείγμα 2, 4, 5, 7). Το ποσοστό της αύξησης στα 3/4 δείγματα κυμαινόταν από 11-14% (δείγμα 4, 5, 7), ενώ σε ένα δείγμα παρατηρήθηκε αύξηση 52% (δείγμα 2). Στα 5/10 δείγματα παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης που κυμαίνονταν από 7%-82% (δείγμα 1, 3, 6, 9, 10). Σε ένα δείγμα η συγκέντρωση της αιθανόλης κατά τη διάρκεια της επώασης παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγμα 8).



ΠΙΝΑΚΑΣ 15

Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν κατά την 40^η ημέρα της επώασης αίματος πτώματος, από αντίστοιχο αριθμό περιστατικών, στους 4°C.

(εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με την συγκέντρωσή τους την ημέρα 0)

α/α	C ₀ αιθανόλης (mg/dL)	% μεταβολή C _{αιθ}	% μεταβολή C _{ακεταλ}	% μεταβολή C _{1προπ}	% μεταβολή C _{ακετον}	% μεταβολή C _{2προπ}
1	0,62	-82%	-22%	-	0%	0%
2	1,66	+52%	-18%	-	-14%	+362%
3	30,3	-65%	+34%	-34%	0%	+457%
4	34,8	+13%	+76%	+4%	+17%	+50%
5	40,3	+14%	+64%	-	+15%	+12%
6	91,2	-7%	+518%	0%	+3%	+4%
7	256	+11%	-27%	+100%	-50%	+400%
8	284	0%	+38%	-12%	+8%	+30%
9	324	-27%	+102%	0%	-24%	+84%
10	555	-30%	+88%	0%	0%	+50%



Στα 4/5 δείγματα αίματος που παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της αιθανόλης υπήρξε αύξηση στη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης (δείγματα 3, 6, 9, 10). Αύξηση στη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης παρατηρήθηκε επίσης στα 2/4 δείγματα που υπήρξε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης (δείγματα 4, 5). Στα 2/4 δείγματα αίματος που υπήρξε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (δείγματα 4, 7), ενώ στα άλλα 2/4 δείγματα δεν ανιχνεύτηκε καθόλου 1-προπανόλη καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Η συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρέμεινε σταθερή στα 3/5 δείγματα που εμφάνισαν μείωση των επιπέδων της αιθανόλης (δείγματα 6, 9, 10), στο 1/5 δείγματα η συγκέντρωση της 1-προπανόλης μειώθηκε (δείγμα 3), ενώ στο 1/5 δείγματα δεν ανιχνεύτηκε 1-προπανόλη καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (δείγμα 1).

Στα 4/7 δείγματα αίματος που υπήρξε αύξηση των επιπέδων της ακεταλδεϋδης παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση στη συγκέντρωση της ακετόνης (δείγματα 4, 5, 6, 8). Η μεταβολή της συγκέντρωσης της ακετόνης δε συσχετίστηκε με τη μεταβολή των συγκεντρώσεων της αιθανόλης σε κανένα δείγμα:

Τέλος, η συγκέντρωση της 2-προπανόλης αυξήθηκε στα 9/10 δείγματα αίματος που μελετήθηκαν (δείγματα 2-10), ενώ στο 1/10 παρέμεινε σταθερή (δείγμα 1).

Οι μετρήσεις των πτητικών κατά την 60^η και 90^η ημέρα της επώασης έδειξαν ότι στα 6/10 δείγματα οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης δε μεταβλήθηκαν σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή την 40^η ημέρα (δείγματα 1, 3-7). Σε 3/10 δείγματα παρατηρήθηκε πτώση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (δείγμα 8: από 284 mg/dL σε 209 mg/dL, δείγμα 9: από 236 mg/dL σε 200 mg/dL, δείγμα 10: από 391 mg/dL σε 348 mg/dL) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή την 40^η ημέρα. Στα 2/3 δείγματα η μείωση ήταν σε συνέχεια της μείωσης που καταγράφηκε την 40^η ημέρα (δείγματα 9, 10), ενώ στο 1/3 δείγματα η μείωση καταγράφηκε την 60^η και 90^η ημέρα (δείγμα 8). Τέλος στο 1/10 δείγματα παρατηρήθηκε μη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης (δείγμα 2).



Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων πτητικών κατά τις μετρήσεις την 60^η και 90^η ημέρα της επώασης παρέμειναν σταθερές ή παρουσίασαν μη σημαντική πτώση σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές την 40^η ημέρα (διακύμανση < 2%).

β. Ούρα

Επιλέχθηκαν 10 δείγματα ούρων, από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, που ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκαν στους 4°C για χρονικό διάστημα 40 ημερών. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με κριτήριο την αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις να ανταποκρίνονται σε όλο το εύρος των μετρηθέντων συγκεντρώσεων αιθανόλης στα ούρα (0,11 mg/dL - 529 mg/dL). Την 0^η, 10^η, 20^η και 40^η ημέρα της επώασης των δειγμάτων αντίστοιχα, μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Οι συγκεντρώσεις όλων των πτητικών που μετρήθηκαν στα ούρα παρέμειναν πρακτικά σταθερές κατά τις πρώτες 20 ημέρες της επώασης. Στην μέτρηση που έγινε κατά την 40^η ημέρα της επώασης οι συγκεντρώσεις όλων των πτητικών μειώθηκαν.

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών που μετρήθηκαν την 40^η ημέρα της επώασης στους 4°C (εκατοστιαία μεταβολή από την αρχική τιμή).

Στο 1/10 δείγματα ούρων (δείγμα 2) παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της ακετόνης κατά 93% και 100% αντίστοιχα, ενώ οι συγκεντρώσεις των άλλων πτητικών ήταν μη μετρήσιμες. Στα υπόλοιπα εννέα δείγματα ούρων δεν παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1-προπανόλης. Πτώση, κυρίως παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των υπολοίπων πτητικών.

Στα περισσότερα δείγματα αίματος και ούρων που μελετήθηκαν ανιχνεύτηκε ποιοτικά, όλες τις ημέρες της επώασης, η παρουσία των παρακάτω



ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν κατά την 40^η ημέρες της επώασης ούρων πτώματος, από αντίστοιχο αριθμό περιστατικών, στους 4°C.

(εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με την συγκέντρωσή τους την ημέρα 0)

Α/Α	C ₀ αιθανόλης (mg/dL)	% μεταβολή C _{αιθ}	% μεταβολή C _{ακεταλ}	% μεταβολή C _{ιπροπ}	% μεταβολή C _{ακετον}	% μεταβολή C _{2πρωπ}
1	0,11	-100%	-	-	-98%	-99%
2	0,15	+93%	-	-	+100%	-
3	0,31	-68%	-	-	+42%	-91%
4	2,32	-35%	-14%	-	+17%	0%
5	56,9	-32%	-50%	-	-29%	0%
6	216	-43%	-	-48%	-20%	-17%
7	349	-26%	+100%	-28%	-27%	-3%
8	358	-23%	-20%	-23%	-24%	-24%
9	364	-32%	-100%	-45%	-30%	-62%
10	529	-4%	-20%	-23%	-14%	-33%



πτητικών ουσιών: αμμωνία, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόνη και 2-βουτανόλη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: Κατά την επώαση των δειγμάτων αίματος στους 4°C για 90 ημέρες η συγκέντρωση της αιθανόλης μπορεί είτε να αυξάνεται (4/10 δείγματα), είτε να μειώνεται (5/10 δείγματα), είτε να παραμένει αμετάβλητη, ενώ για τα δείγματα ούρων παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης σε 9/10.

- Η εκατοστιαία μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης σε σχέση με την αρχική τιμή, τόσο στα δείγματα αίματος όσο και στα δείγματα ούρων, ήταν τόσο μικρότερη όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά.
- Κατά την επώαση (αποθήκευση) των δειγμάτων αίματος και ούρων στους 4°C, απουσία συντηρητικού, η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης μεταβλήθηκε πρακτικά ελάχιστα για 20 ημέρες αποθήκευσης.

3.3.2. Μεταβολή των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

α. Αίμα

Επιλέχθηκαν 10 δείγματα αίματος από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, που ελήφθησαν κατά τη διένεργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 4°C (δείγματα ελέγχου) για χρονικό διάστημα 25 ημερών. Η επιλογή των δειγμάτων αίματος έγινε με τα εξής κριτήρια: (α) την αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις να ανταποκρίνονται στο εύρος των μετρηθέντων συγκεντρώσεων αιθανόλης (0,04 mg/dL - 349 mg/dL) και (β) την έκταση των σηπτικών εξεργασιών των πτωμάτων από τα οποία ελήφθησαν τα δείγματα.

Τα δείγματα 4, 8 και 10 προέρχονταν από πτώματα που βρίσκονταν σε προχωρημένη σήψη, τα δείγματα 5, 6 και 9 από πτώματα που βρίσκονταν σε



αρχόμενη σήψη, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα δείγματα (1, 2, 3, 7) προήλθαν από πτώματα χωρίς εμφανείς σηπτικές εξεργασίες. Την 0^η, 3^η, 7^η, 10^η, 15^η, 20^η και 25^η ημέρα της επώασης των δειγμάτων αντίστοιχα, μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται οι μέγιστες μεταβολές που καταγράφηκαν στη συγκέντρωση της αιθανόλης, καθώς και οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των άλλων πτητικών ουσιών για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα της επώασης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα 8/10 δείγματα αίματος (δείγματα 3-10) παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης, που κυμαίνονταν από 7,46 mg/dL ως 201 mg/dL. Η αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης στα 6/8 δείγματα, παρατηρήθηκε από την 7^η μέχρι την 15^η ημέρα επώασης (δείγματα 4, 5, 6, 7, 9, 10), ενώ στο 1/8 την 3^η ημέρα της επώασης (δείγμα 8) και στο 1/8 την 25^η ημέρα της επώασης (δείγμα 3). Τέλος, στα 2/10 δείγματα παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (δείγματα 1, 2).

Αύξηση στη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης παρατηρήθηκε στα 6/8 δείγματα αίματος που υπήρξε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης (δείγματα 3, 5, 6, 7, 8, 10). Στο 1/8 δείγματα η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης αρχικά μειώθηκε και μετά παρέμεινε σταθερή (δείγμα 4), ενώ σε 1/8 παρουσίασε διακυμάνσεις (δείγμα 9). Σε 1/2 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε, η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης επίσης μειώθηκε (δείγμα 2), ενώ στο άλλο δείγμα η συγκέντρωσή της μειώθηκε τις επτά πρώτες ημέρες της επώασης και στη συνέχεια αυξήθηκε (δείγμα 1).

Αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρατηρήθηκε στα 9/10 δείγματα αίματος, που κυμαίνονταν από 0,35 mg/dL - 13,8 mg/dL (δείγματα 1, 3-10). Στα 8/9 δείγματα που παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις της παρατηρήθηκαν μεταξύ της 7^{ης} και 15^{ης} ημέρας της επώασης (δείγματα 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), ενώ στο 1/9 παρατηρήθηκε την 20^η ημέρα της επώασης (δείγμα 7). Στα 8/10 δείγματα αίματος που παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης υπήρξε παράλληλη



ΠΙΝΑΚΑΣ 17

Μέγιστες μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση της αιθανόλης και οι αντίστοιχες μεταβολές στις συγκεντρώσεις των άλλων πτητικών ουσιών κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αίματος πτώματος, από αντίστοιχο αριθμό περιστατικών.

α/α	Αιθανόλη (mg/dL)			Ακεταλδεϋδη (mg/dL)			1-προπτανόλη (mg/dL)			Ακετόνη (mg/dL)			2-προπτανόλη (mg/dL)		
	ΔC	C _{max}	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀
1	-211	138	349	0,15	0,92	0,77	0,18	0,21	0,03	-0,11	0,23	0,34	0,14	0,33	0,19
2	-124	58,1	182	-0,41	0,29	0,70	-0,01	0,00	0,01	-0,02	0,12	0,14	0,16	0,20	0,04
3	7,46	7,50	0,04	0,81	0,83	0,01	0,67	0,67	0,00	-0,02	0,03	0,05	0,21	0,21	0,00
4	10,4	92,1	81,7	0,96	0,48	1,44	6,55	17,0	10,4	0,26	0,70	0,44	0,29	0,82	0,53
5	21,7	23,0	1,37	1,57	1,85	0,27	2,47	2,71	0,23	0,02	0,07	0,05	0,06	0,06	0,00
6	24,2	26,8	2,57	0,50	0,73	0,23	2,31	2,39	0,08	-0,51	0,18	0,69	0,71	0,77	0,06
7	28,0	28,0	0,04	0,40	0,54	0,14	1,16	1,16	0,00	-0,07	0,02	0,10	0,41	0,42	0,02
8	43,2	106	62,5	0,43	1,28	0,85	3,02	5,38	2,35	0,10	0,17	0,06	0,74	0,78	0,05
9	45,8	46,9	1,09	-0,03	0,50	0,53	3,00	3,06	0,06	-1,20	0,07	1,28	1,60	1,71	0,11
10	200	317	117	2,34	4,57	2,23	13,9	21,0	7,04	0,08	0,23	0,15	5,82	5,92	0,10

αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (δείγματα 3-10). Σε 1/2 δείγματα που παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της αιθανόλης υπήρξε αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (δείγμα 1), ενώ στο άλλο δείγμα η συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή μέχρι την 10^η ημέρα της επώασης και στη συνέχεια μειώθηκε (δείγμα 2). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της ακετόνης με τη μεταβολή των συγκεντρώσεων της αιθανόλης ή των άλλων πτητικών. Τέλος, η συγκέντρωση της 2-προπανόλης αυξήθηκε στα 9/10 δείγματα αίματος που μελετήθηκαν (δείγματα 1-4, 6-10) ενώ στο 1/10 παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγμα 5).

Κατά την επώαση κλασμάτων των ίδιων δειγμάτων αίματος (δείγματα ελέγχου) στους 4°C παρατηρήθηκε ότι στα 2/10 δείγματα η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε και η συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρέμεινε σταθερή (δείγματα 1, 2). Στα δείγματα αυτά, κατά την επώαση στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, η συγκέντρωση της αιθανόλης επίσης μειώθηκε. Στα 3/10 δείγματα αίματος οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης παρέμειναν πρακτικά σταθερές (δείγματα 4, 8, 9). Αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης παρατηρήθηκε στα 5/10 δείγματα αίματος (δείγματα 3, 5, 6, 7, 10). Στα 4/5 δείγματα η συγκέντρωση της 1-προπανόλης αυξήθηκε, ενώ στο 1/5 παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγματα 3, 5, 6, 10).

Στα 6/10 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγματα 1-3, 7-9) ενώ στα 4/10 δείγματα παρατηρήθηκε μη σημαντική αύξηση των επιπέδων της ακεταλδεϋδης (δείγματα 4, 5, 6, 10).

Αύξηση στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης παρατηρήθηκε στα 3/5 δείγματα αίματος που υπήρξε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης (δείγματα 6, 7, 10), ενώ στα 2/5 δείγματα η συγκέντρωση της 2-προπανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγματα 3, 5). Στο 1/3 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή, η συγκέντρωση της 2-προπανόλης αυξήθηκε (δείγμα 8), ενώ στα 2/3 δείγματα η συγκέντρωσή της παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγματα 4, 9).

Τέλος, σε 1/10 δείγματα η συγκέντρωση της ακετόνης αυξήθηκε (δείγμα 10), ενώ στα 9/10 παρέμεινε σταθερή (δείγματα 1-9).



Στα δείγματα αίματος 4, 5, 8, 9, και 10 που προέρχονταν από πτώματα σε σήψη (αρχόμενη ή προχωρημένη), καθώς και στο δείγμα 3 που προέρχονταν από πτώμα χωρίς εμφανείς σηπτικές εξεργασίες, ανιχνεύτηκε ποιοτικά, κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η παρουσία των παρακάτω πτητικών ουσιών: αμμωνία, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόνη, 2 βουτανόλη, 1 βουτανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη. Στο δείγμα 6, που προέρχονταν από πτώμα σε σήψη, εμφανίστηκαν όλα τα παραπάνω πτητικά εκτός του οξικού αιθυλεστέρα. Στο δείγμα 1 ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των παρακάτω πτητικών ουσιών: αμμωνία, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη, βουτανόνη, 2 βουτανόλη και 1 βουτανόλη. Στο δείγμα 2 ανιχνεύτηκαν τα πτητικά: αμμωνία, βουτανόνη, 2 βουτανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη. Τέλος, στο δείγμα 7 ανιχνεύτηκε μόνο η παρουσία βουτανόνης.

Κατά την επώαση των δειγμάτων αίματος στους 4°C ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των παρακάτω πτητικών ουσιών: αμμωνία, οξικός αιθυλεστέρας και βουτανόνη. Κατά την επώαση όμως του δείγματος 10 στους 4°C ανιχνεύτηκε η παρουσία όλων των πτητικών που ανιχνεύτηκαν και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εκτός της 1 βουτανόλης και της ισοαμυλικής αλκοόλης.

β. Ούρα

Επιλέχθηκαν δύο δείγματα ούρων από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, που ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 4°C (δείγματα ελέγχου) για χρονικό διάστημα 25 ημερών. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με κριτήριο την έκταση των σηπτικών εξεργασιών των πτωμάτων από τα οποία ελήφθησαν τα δείγματα και συγκεκριμένα προέρχονταν από πτώματα που βρίσκονταν σε αρχόμενη σήψη. Την 0^η, 3^η, 7^η, 10^η, 15^η, 20^η και 25^η ημέρα της επώασης των δειγμάτων αντίστοιχα, μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.



Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται οι μέγιστες καταγραφηθείσες μεταβολές της συγκέντρωσης της αιθανόλης καθώς και οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των άλλων πτητικών ουσιών για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα της επώασης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο 1/2 δείγματα ούρων παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης και ταυτόχρονα αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (δείγμα 2). Στο άλλο δείγματα παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ η συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή (δείγμα 1). Και στα δύο δείγματα ούρων η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης μειώθηκε, ενώ τα επίπεδα της 2-προπανόλης και της ακετόνης παρέμειναν πρακτικά σταθερά.

Κατά την επώαση κλασμάτων των ίδιων δειγμάτων ούρων (δείγματα ελέγχου) στους 4°C παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης. Μικρή, μη σημαντική, πτώση παρατηρήθηκε και στις συγκεντρώσεις των υπολοίπων πτητικών.

Κατά την επώαση του ενός δείγματος ούρων (δείγμα 2), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των παρακάτω πτητικών ουσιών: αμμωνία, βουτανόνη, 2-βουτανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη. Κατά την επώαση του άλλου δείγματος ούρων (δείγμα 1), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε η παρουσία αμμωνίας, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης, βουτανόνης και 1-βουτανόλης.

Κατά την επώαση των δύο δειγμάτων ούρων στους 4°C, ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών αμμωνία και βουτανόνη.

Τα αποτελέσματα της επώασης των δειγμάτων αίματος και ούρων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έδειξαν ότι:

- Τα επίπεδα της αιθανόλης μεταβλήθηκαν ποικιλοτρόπως και οδήγησαν σε μη προβλέψιμες τελικές συγκεντρώσεις (κυρίως παρατηρήθηκε αύξηση).
- Οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης και της 2-προπανόλης ήταν ανάλογες με τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης.



ΠΙΝΑΚΑΣ 18

Μέγιστες μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση της αιθανόλης και οι αντίστοιχες μεταβολές στις συγκεντρώσεις των άλλων πτητικών ουσιών κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ούρων πτώματος, από αντίστοιχο αριθμό περιστατικών.

α/α	Αιθανόλη (mg/dL)			Ακεταλδεΐδη (mg/dL)			1-προπτανόλη (mg/dL)			Ακετόνη (mg/dL)			2-προπτανόλη (mg/dL)		
	ΔC	C _{max}	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀	ΔC	C _T	C ₀
1	-0,94	3,48	4,42	0,00	0,06	0,06	0,00	0,34	0,34	0,02	0,11	0,09	-0,01	0,01	0,02
2	10,8	14,3	3,53	-0,20	0,11	0,31	2,32	2,64	0,32	-0,01	0,05	0,07	0,08	0,08	0,00



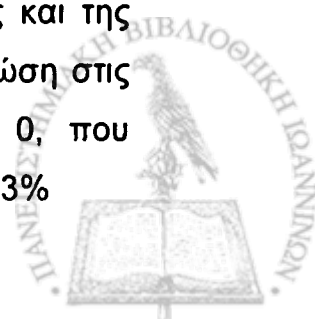
3.4. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης.

3.4.1. Ιχνηθέτηση με αιθανόλη.

Κλάσματα αίματος εθελοντή αιμοδότη (1200 μ L) ιχνηθετήθηκαν με αιθανόλη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι ($C^{IX}_{αιθ}$) 0,00, 0,10, 1,00, 10,0, 25,0, 50,0, 100, 200, 300 και 400 mg/dL αντίστοιχα, και επώαστηκαν, σε σωληνάρια αιμοληψίας είτε στους 4°C είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα της επώασης, αντίστοιχα, έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL από το αντίστοιχο δείγμα και αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός προσδιορισμός.

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 10,0 mg/dL, 25,0 mg/dL, 50,0 mg/dL, 100 mg/dL και 400 mg/dL, κατά την 0^η, 15^η, 60^η, 75^η και 90^η ημέρα της επώασης αντίστοιχα, στους 4°C. Για τα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00 mg/dL, 0,10 mg/dL και 1,00 mg/dL παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης κατά τη 0 ημέρα λόγω εξάτμισης, ενώ για τα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 200 mg/dL και 300 mg/dL, οι μεταβολές ήταν ανάλογες με τις μεταβολές που καταγράφηκαν για τις συγκεντρώσεις 100 mg/dL και 400 mg/dL και για αυτόν τον λόγο δεν αναφέρονται.

Κατά την επώαση των δειγμάτων στους 4°C μέχρι τις 60 ημέρες παρατηρήθηκε αμελητέα μείωση στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης. Μετά την 60^η ημέρα της επώασης παρατηρήθηκε πτώση στις συγκεντρώσεις τους, σε σχέση με τη συγκέντρωση την ημέρα 0, που κυμάνθηκε, κατά την 90^η ημέρα της επώασης, για την αιθανόλη από 23%



ΠΙΝΑΚΑΣ 19

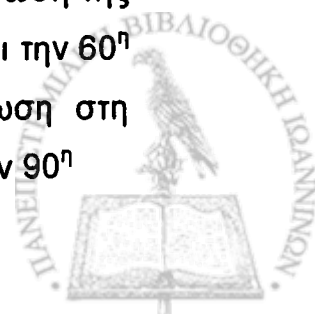
Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης ($C_{\text{ΙΧΝ}}$), κατά την επώαση στους 4°C και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

$C_{\text{ΙΧΝ}}$	10,0 mg/dL		25,0 mg/dL		50,0 mg/dL		100 mg/dL		400 mg/dL	
	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$
0	10,2	1,20	27,2	1,28	49,6	1,29	111	1,27	438	1,23
15	10,4	1,15	25,9	1,31	50,2	1,20	108	1,13	416	1,57
60	7,38	1,15	23,0	1,23	45,6	1,34	101	1,20	418	1,09
75	4,76	0,82	15,7	1,05	35,1	0,97	77,7	1,02	330	0,92
90	3,52	0,73	14,5	0,92	34,9	0,93	77,9	1,04	336	0,88

(από 438 mg/dL την ημέρα 0 ως 336 mg/dL την 90^η ημέρα, για $C^{XV}_{αιθ}=400$ mg/dL) ως 65% (από 10,2 mg/dL την ημέρα 0 ως 3,52 mg/dL την 90^η ημέρα, για $C^{XV}_{αιθ}=10,0$ mg/dL) και για την ακεταλδεϋδη από 18% (από 1,27 mg/dL την ημέρα 0 ως 1,04 mg/dL την 90^η ημέρα, για $C^{XV}_{αιθ}=100$ mg/dL) ως 39% (από 1,20 mg/dL την ημέρα 0 ως 0,73 mg/dL την 90^η ημέρα, για $C^{XV}_{αιθ}=10,0$ mg/dL). Σε όλα τα δείγματα καταγράφηκε παραγωγή ακεταλδεϋδης, όπως και αναμένονταν, λόγω του μεταβολισμού της αιθανόλης προς ακεταλδεϋδη από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) που υπάρχει στα κύτταρα του φυσιολογικού αίματος. Στα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 10,0, 25,0, 50,0, 100, 200, 300 και 400 mg/dL η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης που μετρήθηκε κατά την ημέρα 0 ήταν πρακτικά η ίδια για όλα τα δείγματα και παρέμεινε αμετάβλητη μέχρι και την 60^η ημέρα της επώασης. Οι τιμές των συγκεντρώσεων της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκαν από 1,09 mg/dL ως 1,57 mg/dL.

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης ($C^{XV}_{αιθ}$) 10,0 mg/dL, 25,0 mg/dL, 50,0 mg/dL, 100 mg/dL και 400 mg/dL, κατά την 0^η, 15^η, 60^η, 75^η και 90^η ημέρα αντίστοιχα της επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00 mg/dL, 0,10 mg/dL και 1,00 mg/dL παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης κατά τη 0 ημέρα λόγω εξάτμισης, ενώ για τα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 200 mg/dL και 300 mg/dL, οι μεταβολές ήταν ανάλογες με τις μεταβολές που καταγράφηκαν για τις συγκεντρώσεις 100 mg/dL και 400 mg/dL και για αυτό δεν αναφέρονται.

Στα δείγματα με ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης 10,0 mg/dL, 25,0 mg/dL, και 50,0 mg/dL παρατηρήθηκε, καθόλη τη διάρκεια της επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σταδιακή πτώση στη συγκέντρωση της αιθανόλης που ήταν 0,80 mg/dL, 26,0 mg/dL και 40,7 mg/dL αντίστοιχα. Για τα δείγματα με ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης 100 mg/dL, 200 mg/dL, 300 mg/dL και 400 mg/dL παρατηρήθηκε μικρή μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (< 25% σε σχέση με την αρχική τιμή την ημέρα 0) μέχρι και την 60^η ημέρα της επώασης. Μετά την 60^η ημέρα της επώασης η μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη και κυμάνθηκε, κατά την 90^η



ΠΙΝΑΚΑΣ 20

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης (C_{IV}), κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

C_{IV}	10,0 mg/dL		25,0 mg/dL		50,0 mg/dL		100 mg/dL		400 mg/dL	
	$C_{αιθ}$	$C_{ακεταλ}$	$C_{αιθ}$	$C_{ακεταλ}$	$C_{αιθ}$	$C_{ακεταλ}$	$C_{αιθ}$	$C_{ακεταλ}$	$C_{αιθ}$	$C_{ακεταλ}$
0	0,80	0,49	26,0	1,26	52,2	1,27	112	1,29	440	1,07
15	0,00	0,00	11,7	0,70	38,4	0,89	92,3	0,84	415	0,76
60	0,00	0,00	1,27	0,14	25,3	0,18	84,5	0,17	418	0,18
75	0,00	0,00	0,00	0,04	15,6	0,19	61,8	0,22	321	0,20
90	0,00	0,00	0,00	0,00	11,7	0,16	61,6	0,16	322	0,19

ημέρα, από 27% (από 440 mg/dL την ημέρα 0 ως 322 mg/dL, για $C^{IX}_{αθ}=400$ mg/dL) ως 45% (από 112 mg/dL ως 61,8 mg/dL, για $C^{IX}_{αθ}=100$ mg/dL).

Κατά την επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρατηρήθηκε παραγωγή ακεταλδεϋδης, όπως αναμένονταν σαν συνέπεια της δράσης του ενζύμου ADH. Στα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 25,0 mg/dL, 50,0 mg/dL, 100 mg/dL, 200 mg/dL, 300 mg/dL και 400 mg/dL η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης που μετρήθηκε κατά την ημέρα 0 ήταν πρακτικά η ίδια για όλα τα δείγματα και παρέμεινε αμετάβλητη μέχρι και την 7^η ημέρα της επώασης. Οι τιμές των συγκεντρώσεων της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκαν από 1,07 mg/dL ως 1,29 g/L. Από την 15^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκε σημαντική πτώση στη συγκέντρωσή της.

Το αίμα του εθελοντή αιμοδότη που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα αναλύθηκε για την παρουσία πτητικών πριν ιχνηθετηθεί με αιθανόλη ή/και ακεταλδεϋδη. Κατά την αέριο χρωματογραφική ανάλυση ανιχνεύτηκε ακετόνη και 2-προπανόλη. Στα δείγματα που επώαστηκαν στους 4°C, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, η συγκέντρωση της ακετόνης παρέμεινε πρακτικά σταθερή και κυμάνθηκε από 0,14 mg/dL ως 0,23 mg/dL, ενώ η συγκέντρωση της 2-προπανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή και κυμάνθηκε από 0,01 mg/dL ως 0,10 mg/dL.

Στα δείγματα που επώαστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης και της 2-προπανόλης παρέμειναν πρακτικά σταθερές και κυμάνθηκαν από 0,16 mg/dL ως 0,27 mgd/L και 0,01 mg/dL ως 0,09 mg/dL για την ακετόνη και την 2-προπανόλη αντίστοιχα.

Η 1-προπανόλη δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, καθόλη τη διάρκεια της επώασης τόσο στους 4° C όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, κατά την επώαση τόσο στους 4°C όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών: αμμωνία, μεθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας.



3.4.2. Ιχνηθέτηση με ακεταλδεΐδη.

Κλάσματα αίματος εθελοντή αιμοδότη (1200 μL) ιχνηθετήθηκαν με ακεταλδεΐδη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι ($C^{\text{IXV}}_{\text{ακεταλ}}$) 0,00, 0,10, 1,00, 10,0, 25,0, 50,0 και 100 mg/dL αντίστοιχα, και επωάστηκαν, σε σωληνάρια αιμοληψίας είτε στους 4°C είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα της επώασης, αντίστοιχα, έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL από το αντίστοιχο δείγμα και αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός προσδιορισμός.

Στους Πίνακες 21 και 22 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης 10,0 mg/dL, 25,0 mg/dL, 50,0 mg/dL και 100 mg/dL, κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 30^η και 90^η ημέρα της επώασης στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αντίστοιχα. Για τα δείγματα με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης 0,00 mg/dL, 0,10 mg/dL και 1,00 mg/dL παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης κατά τη 0^η ημέρα λόγω εξάτμισής της.

Η ακεταλδεΐδη αποτελεί μια πολύ πτητική ουσία (σ.ζ. 21°C), συνεπώς κατά την επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρατηρήθηκε πολύ έντονη εξάτμισή της. Σημαντική εξάτμιση παρατηρήθηκε ακόμα και κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων στους 4°C.

Η αιθανόλη ανιχνεύτηκε μόνο στα δείγματα με ιχνηθετημένη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης 25,0 mg/dL, 50,0 mg/dL και 100 mg/dL κατά την 7^η και 15^η ημέρα της επώασης στους 4°C, σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,08 mg/dL ως 0,21 mg/dL.

Η συγκέντρωση της ακετόνης παρέμεινε πρακτικά σταθερή, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, και κυμάνθηκε από 0,12 mg/dL ως 0,17 mg/dL, στα δείγματα που επωάστηκαν στους 4°C και από 0,13 mg/dL ως 0,28 mg/dL, στα δείγματα που επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



ΠΙΝΑΚΑΣ 21

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεύδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις ακεταλδεύδης ($C_{\text{ΙΧΝ}}$), κατά την επώαση στους 4°C και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

$C_{\text{ΙΧΝ}}$	10,0 mg/dL		25,0 mg/dL		50,0 mg/dL		100 mg/dL	
	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$
0	0,00	6,95	0,00	18,4	0,00	38,4	0,00	77,1
7	0,00	3,80	0,10	12,4	0,16	27,8	0,21	61,5
15	0,00	1,70	0,08	7,44	0,14	21,2	0,18	48,4
30	0,00	0,33	0,00	2,29	0,00	10,7	0,00	28,9
90	0,00	0,02	0,00	0,12	0,00	0,64	0,00	4,62

ΠΙΝΑΚΑΣ 22

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης ($C_{\gamma\alpha\lambda}$), κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

$C_{\gamma\alpha\lambda}$	10,0 mg/dL		25,0 mg/dL		50,0 mg/dL		100 mg/dL	
	$C_{\alpha\iota\theta}$	$C_{\alpha\iota\kappa\epsilon\tau\alpha\lambda}$	$C_{\alpha\iota\theta}$	$C_{\alpha\iota\kappa\epsilon\tau\alpha\lambda}$	$C_{\alpha\iota\theta}$	$C_{\alpha\iota\kappa\epsilon\tau\alpha\lambda}$	$C_{\alpha\iota\theta}$	$C_{\alpha\iota\kappa\epsilon\tau\alpha\lambda}$
0	0,00	6,57	0,00	16,7	0,00	40,7	0,00	76,9
7	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,22	0,00	2,81
15	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,11	0,00	1,44
30	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,06	0,00	1,13
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39

Τέλος, σε κανένα δείγμα δεν καταγράφηκε παρουσία 1-προπανόλης και 2-προπανόλης.

Στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, κατά την επώαση τόσο στους 4°C όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία αμμωνίας.

3.4.3. Ιχνηθέτηση με μίγμα αιθανόλης-ακεταλδεϋδης.

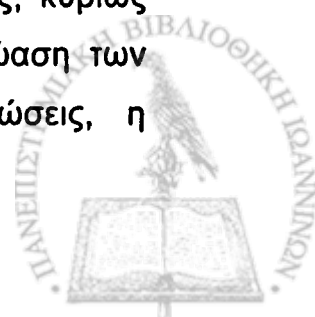
Κλάσματα αίματος εθελοντή αιμοδότη (1200 μ L) ιχνηθετήθηκαν με αιθανόλη και ακεταλδεϋδη έτσι ώστε η τελική ιχνηθετημένη συγκέντρωση της αιθανόλης ($C^{IXV}_{αιθ}$) και της ακεταλδεϋδης ($C^{IXV}_{ακεταλ}$) να είναι:

- $C^{IXV}_{αιθ}$ 0,00 mg/dL- $C^{IXV}_{ακεταλ}$ 0,00 mg/dL,
- $C^{IXV}_{αιθ}$ 50,0 mg/dL- $C^{IXV}_{ακεταλ}$ 1,00 mg/dL,
- $C^{IXV}_{αιθ}$ 100 mg/dL - $C^{IXV}_{ακεταλ}$ 1,00 mg/dL,
- $C^{IXV}_{αιθ}$ 50,0 mg/dL- $C^{IXV}_{ακεταλ}$ 10,0 mg/dL,
- $C^{IXV}_{αιθ}$ 50,0 mg/dL- $C^{IXV}_{ακεταλ}$ 50,0 mg/dL.

Τα δείγματα επωάστηκαν, σε σωληνάρια αιμοληψίας είτε στους 4°C είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την 0^η, 7^η, 15^η, 20^η, 25^η, 40^η, 60^η, 75^η, 90^η ημέρα της επώασης, αντίστοιχα, έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL από το αντίστοιχο δείγμα και μετρήθηκαν με αέρια χρωματογραφία οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός έλεγχος.

Στους Πίνακες 23 και 24 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα για όλα τα ζεύγη των ιχνηθετημένων συγκεντρώσεων αιθανόλης και ακεταλδεϋδης, κατά την 0^η, 15^η, 45^η, 60^η και 90^η ημέρα της επώασης στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αντίστοιχα.

Για όλα τα δείγματα και για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης παρουσίασε σημαντική μείωση κατά τη διάρκεια της επώασης λόγω εξάτμισης, κυρίως κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατά την επώαση των δειγμάτων στους 4°C για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις, η



ΠΙΝΑΚΑΣ 23

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης ($C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}}$) και ακεταλδεϋδης ($C_{\text{ακεταλ}}^{\text{IXV}}$), κατά την επώαση στους 4°C και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

Ημέρες επώασης	$C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{IXV}}$ 1,00 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}}$ 100 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{IXV}}$ 1,00 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{IXV}}$ 10,0 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{IXV}}$ 50,0 mg/dL	
	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$
0	54,4	2,07	98,1	1,75	54,5	12,0	52,7	50,5
15	48,9	1,64	95,5	1,49	50,2	3,45	48,4	17,9
45	48,8	1,47	100	1,33	47,6	1,77	47,5	09,4
60	37,5	1,06	74,6	1,18	36,5	1,20	35,3	6,18
90	33,5	1,31	68,3	1,08	35,7	1,17	30,5	3,75

ΠΙΝΑΚΑΣ 24

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης ($C_{\text{αιθ}}^{\text{ΙΧ}}$) και ακεταλδεϋδης ($C_{\text{ακεταλ}}^{\text{ΙΧ}}$), κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

ΗΜΕΡΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ	$C_{\text{αιθ}}^{\text{ΙΧ}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{ΙΧ}}$ 1,00 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{ΙΧ}}$ 100 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{ΙΧ}}$ 1,00 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{ΙΧ}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{ΙΧ}}$ 10,0 mg/dL		$C_{\text{αιθ}}^{\text{ΙΧ}}$ 50,0 mg/dL $C_{\text{ακεταλ}}^{\text{ΙΧ}}$ 50,0 mg/dL	
	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$	$C_{\text{αιθ}}$	$C_{\text{ακεταλ}}$
0	54,2	1,73	96,1	1,78	57,5	11,9	54,2	51,2
15	40,2	0,75	94,2	0,72	35,9	0,78	34,4	1,14
45	32,4	0,33	62,3	0,36	28,5	0,35	30,8	0,64
60	19,6	0,27	54,3	0,29	19,6	0,34	19,7	0,60
90	17,5	0,42	47,0	0,25	16,4	0,29	13,0	0,60

συγκέντρωση της αιθανόλης διατηρήθηκε σταθερή μέχρι την 45^η ημέρα της επώασης. Κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος των δειγμάτων με ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης 50,0 mg/dL καταγράφηκε μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης από τη 15^η ημέρα της επώασης και μετά, ενώ για τα δείγματα με ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης 100 mg/dL σημαντική μείωση στη συγκέντρωσή της καταγράφηκε μετά την 45^η ημέρα της επώασης.

Η συγκέντρωση της ακετόνης, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης, παρέμεινε πρακτικά σταθερή και κυμάνθηκε από 0,12 mg/dL ως 0,18 mg/dL, στα δείγματα που επωάστηκαν στους 4°C και από 0,12 mg/dL ως 0,20 mg/dL στα δείγματα που επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τέλος, σε κανένα δείγμα δεν καταγράφηκε η παρουσία 1-προπανόλης και 2-προπανόλης.

Στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης και ακεταλδεϋδης, κατά την επώαση τόσο στους 4°C όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των πτητικών ουσιών: αμμωνία, μεθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη παρουσία ή απουσία αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης, έδειξαν ότι:

- Τα επίπεδα αιθανόλης παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα, στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη που ιχνηθετήθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης, κατά την επώαση (αποθήκευση) στους 4°C για 60 ημέρες.
- Στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη που ιχνηθετήθηκαν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης ≥ 100 mg/dL, μετά από επώαση 60 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρατηρήθηκε μικρή μείωση των επιπέδων αιθανόλης, ενώ
- στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη που ιχνηθετήθηκαν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης $\leq 50,0$ mg/dL, μετά από επώαση 60 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της αιθανόλης.



- Τα επίπεδα της αιθανόλης στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη κατά την επώαση τόσο στους 4°C όσο και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν επηρεάζονται από τη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης.
- Οι συγκεντρώσεις των άλλων πτητικών ουσιών (2-προπανόλη, ακετόνη) δεν επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης για όλες τις συγκεντρώσεις ιχνηθέτησης που χρησιμοποιήθηκαν.
- Δεν ανιχνεύτηκε 1-προπανόλη σε κανένα από τα παραπάνω δείγματα.

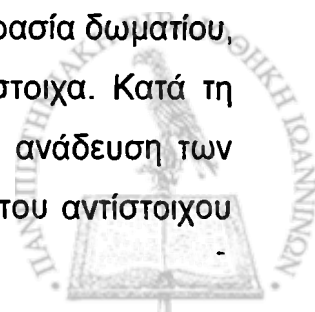


3.5. Μελέτη της επίδρασης του υπερκείμενου αέρα των περιεκτών αποθήκευσης των βιολογικών υλικών στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών.

Η ποσότητα του υπερκείμενου αέρα και η επιφάνεια επαφής με το δείγμα στους περιέκτες αποθήκευσης βιολογικών υλικών που λαμβάνονται από πτώματα, αναμένεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πιθανόν να υπάρχουν στα βιολογικά υλικά ιδιαίτερα όταν αυτά προέρχονται από πτώματα σε σήψη. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του υπερκείμενου αέρα των περιεκτών αποθήκευσης των βιολογικών υλικών που λαμβάνονται από πτώματα, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, στη συγκέντρωση της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών, τοποθετήθηκε κλάσμα 0,5 mL αίματος ή ούρων σε φιαλίδια chromacol και σε σωληνάρια αιμοληψίας και πλαστικά φιαλίδια, για αίμα και ούρα αντίστοιχα. Στα φιαλίδια chromacol, εξαιτίας των διαστάσεών τους, περιέχονταν μεγαλύτερος όγκος αέρα σε σχέση με τα σωληνάρια αιμοληψίας και τα πλαστικά φιαλίδια και επιπλέον, η επιφάνεια επαφής μεταξύ του δείγματος και του υπερκείμενου αέρα ήταν μεγαλύτερη. Κατά συνέπεια η ανάπτυξη και η δράση των μικροοργανισμών που πιθανόν να υπήρχαν στα βιολογικά υλικά, θα επηρεαζόταν σε διαφορετικό βαθμό στα φιαλίδια chromacol από ότι στα σωληνάρια αιμοληψίας και τα πλαστικά φιαλίδια.

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε δείγματα αίματος και ένα δείγμα ούρων, που ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων. Η επιλογή των υλικών έγινε με κριτήριο τη συγκέντρωση της αιθανόλης κατά την πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής (από 1,21 mg/dL ως 303 mg/dL). Επιπλέον, το ένα δείγμα που επιλέχθηκε προέρχονταν από πτώμα που βρίσκονταν σε στάδιο προχωρημένης σήψης, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα από πτώματα χωρίς εμφανείς σηπτικές εξεργασίες.

Κλάσμα αίματος 0,5 mL τοποθετήθηκε σε φιαλίδια chromacol (πέντε φιαλίδια για κάθε δείγμα). Τα φιαλίδια επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό θάλαμο, για 7, 10, 15, 20 και 25 ημέρες, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιούνταν καθημερινά ήπια ανάδευση των φιαλιδίων. Δείγματα ελέγχου (control) αποτέλεσαν κλάσματα του αντίστοιχου

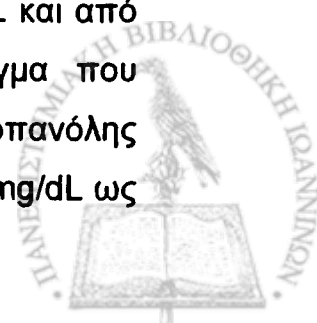


δείγματος αίματος ή ούρων που επωάστηκαν για αντίστοιχες ημέρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σωληνάρια αιμοληψίας ή πλαστικά σωληνάρια, αντίστοιχα.

Τα δείγματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία την αντίστοιχη μέρα της μέτρησης και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Για τις υπόλοιπες πτητικές ουσίες πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτικός προσδιορισμός.

Στα 2/5 δείγματα αίματος που επωάστηκαν στα φιαλίδια chromacol, παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (από 1,21 mg/dL ως 68,3 mg/dL, $\Delta C_{αιθ}$ =67,1 mg/dL και στο δείγμα από πτώμα σε σήψη από 16,9 mg/dL ως 71,1 mg/dL, $\Delta C_{αιθ}$ =54,2 mg/dL, αντίστοιχα) και παράλληλα συνεχής αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (από 0,00 mg/dL ως 1,55 mg/dL, $\Delta C_{1προπ}$ =1,55 mg/dL και από 2,62 mg/dL ως 33,3 mg/dL, $\Delta C_{1προπ}$ =30,7 mg/dL, αντίστοιχα) μέχρι την 25^η ημέρα της επώασης. Ταυτόχρονα στο ένα δείγματα παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση των συγκεντρώσεων της ακεταλδεϋδης (από 0,03 mg/dL ως 0,42 mg/dL, $\Delta C_{ακεταλ}$ =0,39 mg/dL), ενώ στο δείγμα από πτώμα σε σήψη η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης παρουσίασε διακυμάνσεις. Και στα δύο δείγματα παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης (από 0,62 mg/dL ως 6,05 mg/dL, $\Delta C_{2προπ}$ =5,43 mg/dL και στο δείγμα από πτώμα σε σήψη από 0,12 mg/dL ως 6,43 mg/dL, $\Delta C_{2προπ}$ =6,31 mg/dL, αντίστοιχα).

Στα αντίστοιχα σωληνάρια αιμοληψίας παρατηρήθηκε την 7^η ή την 10^η ημέρα της επώασης, αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (από 1,21 mg/dL ως 22,7 mg/dL, $\Delta C_{αιθ}$ =21,5 mg/dL και για το δείγμα από πτώμα σε σήψη 16,9 mg/dL ως 221 mg/dL, $\Delta C_{αιθ}$ =204 mg/dL, αντίστοιχα) και παράλληλη αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (από 0,00 mg/dL ως 1,14 mg/dL, $\Delta C_{1προπ}$ =1,14 mg/dL και από 2,62 mg/dL ως 4,69 mg/dL, $\Delta C_{1προπ}$ =2,07 mg/dL, αντίστοιχα). Την 7^η ή την 10^η της επώασης παρατηρήθηκε και στα δύο δείγματα αύξηση στη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης (από 0,03 mg/dL ως 0,63 mg/dL, $\Delta C_{ακεταλ}$ =0,60 mg/dL και από 12,4 mg/dL ως 2,52 mg/dL, $\Delta C_{ακεταλ}$ =1,28 mg/dL για το δείγμα που προέρχονταν από πτώμα σε σήψη) και στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης (από 0,62 mg/dL ως 2,55 mg/dL, $\Delta C_{2προπ}$ =1,39 mg/dL και από 0,12 mg/dL ως



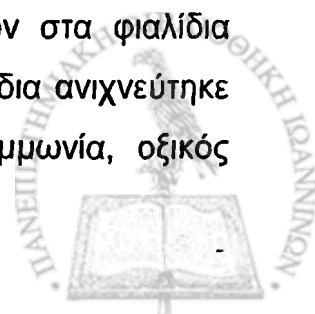
0,58 mg/dL, $\Delta C_{2\text{προπ}}=0,46$ mg/dL στο δείγμα από πτώμα σε σήψη), ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των συγκεντρώσεών τους.

Στα 2/5 δείγματα αίματος παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης καθόλη τη διάρκεια της επώασης τόσο στα δείγματα που περιέχονταν στα φιαλίδια chomacol, όσο και στα δείγματα που περιέχονταν σε σωληνάρια αιμοληψίας. Στο 1/2 δείγματα οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης μηδενίστηκαν μετά την 20^η ημέρα της επώασης, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και 2-προπανόλης παρέμειναν μηδενικές καθόλη τη διάρκεια της επώασης. Στο δεύτερο δείγμα η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 303 mg/dL και κατά την επώαση στα φιαλίδια chomacol η συγκέντρωση της αιθανόλης πρακτικά μηδενίστηκε την 25^η ημέρα της μέτρησης (0,12 mg/dL), ενώ κατά την επώαση στα σωληνάρια αιμοληψίας η συγκέντρωσή της μειώθηκε την 25^η ημέρα της μέτρησης στα 215 mg/dL. Ανάλογη μεταβολή καταγράφηκε για τα υπόλοιπα πτητικά.

Τέλος, στο 1/5 δείγματα αίματος, κατά την επώαση στα φιαλίδια chomacol, καταγράφηκε μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης καθώς και της 1-προπανόλης την 7^η ημέρα της επώασης και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεών τους μέχρι την 25^η ημέρα της μέτρησης. Κατά την επώαση του ίδιου δείγματος στο σωληνάριο αιμοληψίας καταγράφηκε συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και της 1-προπανόλης μέχρι την 15^η ημέρα της επώασης. Ανάλογη μεταβολή καταγράφηκε για τα υπόλοιπα πτητικά.

Κατά την επώαση του δείγματος ούρων σε φιαλίδια chomacol παρατηρήθηκε συνεχής μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (από 1,22 mg/dL την ημέρα 0 σε 0,00 mg/dL την 15^η ημέρα). Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων πτητικών παρέμειναν μηδενικές καθόλη τη διάρκεια της επώασης. Κατά την επώαση του ίδιου δείγματος στο σωληνάριο αιμοληψίας οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης παρέμειναν πρακτικά σταθερές. Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων πτητικών ήταν μηδενικές καθόλη τη διάρκεια της επώασης

Κατά την επώαση των δειγμάτων αίματος και ούρων στα φιαλίδια chomacol και στα σωληνάρια αιμοληψίας και πλαστικά φιαλίδια ανιχνεύτηκε ποιοτικά η παρουσία των παρακάτω πτητικών ουσιών: αμμωνία, οξικός



αιθυλεστέρας, μεθανόλη, βουτανόνη, 2-βουτανόλη, 1-βουτανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Η αύξηση της ποσότητας του αέρα που βρίσκεται σε επαφή με τα βιολογικά υλικά που προέρχονται από πτώματα, μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό και μη προβλέψιμο τρόπο (είτε αύξηση είτε μείωση είτε μείωση και μετά αύξηση) τα αρχικά επίπεδα της αιθανόλης που υπήρχαν στο δείγμα, εξαιτίας πιθανόν του διαφορετικού μικροβιακού φορτίου που αναπτύσσεται.
- Η μείωση της επιφάνειας επαφής του δείγματος με τον υπερκείμενο αέρα έχει σαν συνέπεια μεγαλύτερη και πιο γρήγορη αύξηση στα επίπεδα της αιθανόλης.
- Στα δείγματα βιολογικών υλικών όπου καταγράφεται αύξηση στην συγκέντρωση της αιθανόλης, καταγράφεται παράλληλα σταδιακή και συνεχής αύξηση των επιπέδων της 1-προπανόλης, ανεξάρτητα από την ποσότητα του υπερκείμενου αέρα ή της επιφάνειας επαφής με το δείγμα.



3.6. Μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης σε αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά τον ενοφθαλμισμό του με αίμα πτώματος.

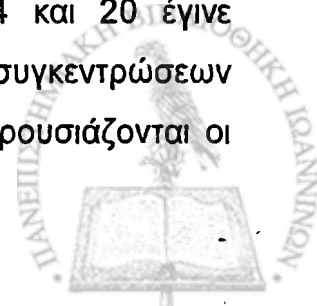
Κάθε πτώμα αποτελεί μοναδικό και πολύπλοκο βιοχημικό σύστημα. Αμέσως μετά το θάνατο άρχονται οι σηπτικές εξεργασίες οι οποίες αποτελούν συνάρτηση των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται, του διαθέσιμου θρεπτικού μέσου, των περιβαλλοντικών συνθηκών και του χρόνου. Η μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή της αιθανόλης εξαρτάται από την έκταση των σηπτικών εξεργασιών που έχουν λάβει χώρα στο πτώμα, και συνεπώς μπορεί να διαφέρει από πτώμα σε πτώμα ανάλογα με τους παράγοντες από τους οποίους επηρεάζονται οι σηπτικές εξεργασίες.

Η μελέτη της μικροβιακής παραγωγής της αιθανόλης έγινε σε δύο δείγματα αίματος που ελήφθησαν, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων που βρίσκονταν σε σήψη. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με κριτήριο τη συγκέντρωση της αιθανόλης (στο ένα δείγμα η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν «ένοχη» ($> 50,0 \text{ mg/dL}$) και στο άλλο δείγμα μη «ένοχη» ($< 50,0 \text{ mg/dL}$) και τις υψηλές συγκεντρώσεις των πτητικών ουσιών 1-προπανόλη ($> 0,10 \text{ mg/dL}$), ακεταλδεΐδη ($> 0,50 \text{ mg/dL}$) και 2-προπανόλη ($0,10 \text{ mg/dL}$), κατά την πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή. Συγκεκριμένα ήταν το δείγμα 7 του Σχήματος 12 που χαρακτηρίστηκε ως Περιστατικό 1 και το δείγμα 8 του Σχήματος 13 που χαρακτηρίστηκε ως Περιστατικό 2.

3.6.1. Έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης.

α. Περιστατικό 1

Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επωάστηκε στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντίστοιχα. Κατά την ημέρα 0, 8, 10, 14 και 20 έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος $0,5 \text{ mL}$ και μέτρηση των συγκεντρώσεων των πτητικών με αέρια χρωματογραφία. Στον Πίνακα 25 παρουσιάζονται οι



Πίνακας 25

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στο αίμα του Περιστατικού 1, κατά την επώαση στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Θ.Π.) και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

Ημέρες	Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/dL)		Συγκέντρωση 1-προπανόλης (mg/dL)	
	4°C	Θ.Π.	4°C	Θ.Π.
0	18,8	18,8	2,50	2,50
8	18,8	236	2,50	3,90
10	20,1	268	2,70	4,40
14	19,4	218	2,80	4,90
20	18,5	146	2,70	7,60



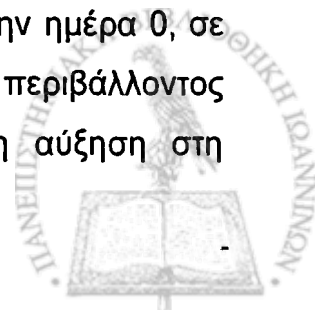
συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετρήθηκε την ημέρα 0 ήταν 18,8 mg/dL και της 1-προπανόλης ήταν 2,50 mg/dL. Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 25 κατά την επώαση του δείγματος για 20 ημέρες στους 4°C, τα επίπεδα της αιθανόλης και της 1-προπανόλης παρέμειναν πρακτικά αμετάβλητα (η συγκέντρωση της αιθανόλης κυμάνθηκε από 18,5 mg/dL ως 20,1 mg/dL, ενώ της 1-προπανόλης από 2,50 mg/dL ως 2,80 mg/dL). Κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μέχρι την 10^η ημέρα της επώασης καταγράφηκε αύξηση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (από 18,8 mg/dL την ημέρα 0, σε 268 mg/dL τη 10^η ημέρα), και στη συνέχεια (την 14^η και 20^η ημέρα) παρατηρήθηκε σταδιακή μείωσή της (146 mg/dL την 20^η ημέρα). Η συγκέντρωση της 1-προπανόλης αυξανόταν σταδιακά σε όλη τη διάρκεια της επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (από 2,50 mg/dL την ημέρα 0 σε 7,60 mg/dL την 20^η ημέρα).

β. Περιστατικό 2

Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, και επώαστηκε στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντίστοιχα. Κατά την ημέρα 0, 8, 10, 14 και 20 έγινε δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL και μέτρηση των συγκεντρώσεων των πτητικών με αέρια χρωματογραφία. Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετρήθηκε την ημέρα 0 ήταν 112 mg/dL και της 1-προπανόλης ήταν 7,10 mg/dL. Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 26 κατά την επώαση στους 4°C για 20 ημέρες, τα επίπεδα της αιθανόλης και της 1-προπανόλης αυξήθηκαν (η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξήθηκε από 112 mg/dL την ημέρα 0, σε 266 mg/dL την 20^η ημέρα, ενώ η συγκέντρωση της 1-προπανόλης αυξήθηκε από 7,10 mg/dL την ημέρα 0, σε 18,3 mg/dL την 20^η ημέρα). Κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και την 10^η ημέρα της επώασης καταγράφηκε η μέγιστη αύξηση στη



ΠΙΝΑΚΑΣ 26

Συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στο αίμα του Περιστατικού 2, κατά την επώαση στους 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Θ.Π.) και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

Ημέρες	Συγκέντρωση αιθανόλης (mg/dL)		Συγκέντρωση 1-προπανόλης (mg/dL)	
	4°C	Θ.Π.	4°C	Θ.Π.
0	112	112	7,10	7,10
8	121	342	9,80	21,1
10	186	344	11,5	21,2
14	239	339	15,9	20,1
20	266	301	18,3	19,7



συγκέντρωση της αιθανόλης (από 112 mg/dL την ημέρα 0 σε 344 mg/dL τη 10^η ημέρα), ενώ στη συνέχεια (την 14^η και 20^η ημέρα) παρατηρήθηκε μικρή μείωσή της (301 mg/dL την 20^η ημέρα). Αντίστοιχα, την 10^η ημέρα της επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος καταγράφηκε και η μέγιστη αύξηση στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης (από 7,10 mg/dL την ημέρα 0 σε 21,2 mg/dL την 20^η ημέρα), ενώ στη συνέχεια (την 14^η και 20^η ημέρα) παρατηρήθηκε μικρή μείωσή της (19,7 mg/dL την 20^η ημέρα).

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι:

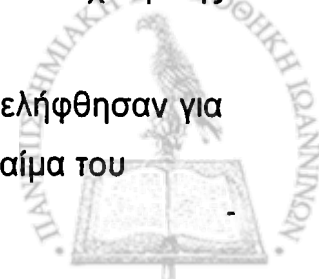
- Κατά την επώαση των δειγμάτων αίματος (Περιστατικό 1 και Περιστατικό 2) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης.
- Η αύξηση, λόγω της προέλευσης των δειγμάτων από πτώματα σε σήψη, αποδόθηκε στην ύπαρξη μικροβιακού φορτίου στα δείγματα αίματος, που είχαν τη «δυναμική» για παραγωγή αιθανόλης και άλλων πτητικών ουσιών.

3.6.2. Ενοφθαλισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος.

α. Περιστατικό 1

Κλάσμα αίματος 200 μ L του Περιστατικού 1, που είχε παραμείνει για 24 ημέρες στους 4°C, χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλισμό 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη που περιέχονταν σε σωληνάρια αιμοληψίας. Το αίμα του εθελοντή αιμοδότη είχε ιχνηθετηθεί προηγουμένως με αιθανόλη έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης να είναι: 0,00, 50,0, 100, 300 και 600 mg/dL αντίστοιχα. Αμέσως μετά τον ενοφθαλισμό πραγματοποιήθηκε ανάλυση κλάσματος αίματος 0,5 mL από κάθε δείγμα με αέρια χρωματογραφία (ημέρα 0). Τα σωληνάρια πωματίστηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατά την ημέρα 1, 3, 6, 10 και 17, αντίστοιχα, γίνονταν δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL από κάθε σωληνάριο, για να αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία, επαναπωματισμός και συνέχιση της επώασης.

Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τη συγκέντρωση της αιθανόλης. Σε όλα τα ενοφθαλισμένα, με αίμα του



ΠΙΝΑΚΑΣ 27

Συγκεντρώσεις αιθανόλης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης (C_{ixv}), μετά τον ενόφθαλμισμό του με αίμα του Περιστατικού 1, κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

C_{ixv} (mg/dL)	0,00	50,0	100	300	600
Ημέρες	Συγκεντρώσεις αιθανόλης (mg/dL)				
0	0,70	54,0	108	331	627
1	1,50	53,2	110	326	599
3	0,30	51,2	102	319	638
6	31,4	78,2	144	353	672
10	30,8	84,1	151	384	709
17	24,7	83,3	143	377	703

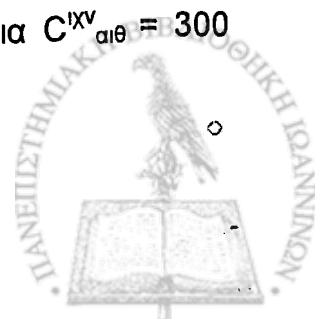


Περιστατικού 1, δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, καταγράφηκε παραγωγή αιθανόλης. Την 3^η ημέρα της επώασης καταγράφηκε μικρή πτώση στη συγκέντρωση της αιθανόλης (όταν η ιχνηθετημένη συγκέντρωση της αιθανόλης, $C^{IXV}_{αιθ}$, ήταν 600 mg/dL, η πτώση παρατηρήθηκε την 1^η ημέρα). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης καταγράφηκαν την 10^η ημέρα της επώασης (όταν η ιχνηθετημένη συγκέντρωση της αιθανόλης, $C^{IXV}_{αιθ}$, ήταν 0,00 mg/dL, η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε την 6^η ημέρα). Η μέγιστη αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης ήταν

- 30,7 mg/dL (4300%), από 0,70 mg/dL σε 31,4 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 0,00 mg/dL,
- 30,1 mg/dL (54.3%), από 54,0 mg/dL σε 84,1 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 50,0 mg/dL,
- 43,0 mg/dL (40%), από 108 mg/dL σε 151 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 100 m/dL,
- 53,0 mg/dL (16%), από 331 mg/dL σε 384 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 300 mg/dL και
- 82,0 mg/dL (12.2%), από 627 mg/dL σε 709 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 0.0 mg/dL.

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τη συγκέντρωση της 1-προπανόλης. Η συγκέντρωση της 1-προπανόλης αυξανόταν σταδιακά κατά τις 10 πρώτες ημέρες της επώασης, ενώ κατά τις επόμενες ημέρες παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητη ή μειώθηκε ελάχιστα. Η μέγιστη αύξηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης ήταν:

- 0,70 mg/dL (700%), από 0,10 mg/dL σε 0,80 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 0,00$ mg/dL,
- 0,90 mg/dL (900%), από 0,10 mg/dL σε 1,00 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 50,0$ mg/dL,
- 01,20 mg/dL (1200%), από 0,10 mg/dL σε 1,30 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 100$ mg/dL,
- 2,30 mg/dL (2300%), από 0,10 mg/dL σε 2,40 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 300$ mg/dL, και



ΠΙΝΑΚΑΣ 28

Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης ($C_{\text{ΙΧΝ}}$), μετά τον ένοφθαλμισμό του με αίμα του Περιστατικού 1, κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

$C_{\text{ΙΧΝ}}$ (mg/dL)	0,00	50,0	100	300	600
Ημέρες	Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης (mg/dL)				
0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
3	0,30	0,90	0,20	0,40	0,30
6	0,80	1,00	1,20	2,20	3,60
10	0,70	1,00	1,30	2,40	3,80
17	0,60	1,00	1,10	2,30	3,40



- 3,70 mg/dL (3700%), από 0,10 mg/dL σε 3,80 mg/dL, για $C_{\text{αιθ}}^{\text{IXV}} = 600$ mg/dL,

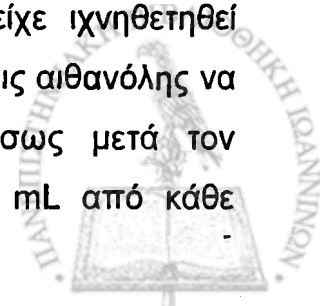
Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεσή μας ότι η παραγωγή αιθανόλης στο αίμα εθελοντή αιμοδότη, κατά τον ενοφθαλμισμό με το αίμα του Περιστατικού 1, οφειλόταν στο μικροβιακό φορτίο του αίματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε δύο σειρές δειγμάτων ελέγχου.

Στην πρώτη σειρά δειγμάτων ελέγχου πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00, 50,0, 100, 300 και 600 mg/dL αντίστοιχα, με αίμα από πτώμα που δεν παρουσίαζε ενδείξεις μικροβιακής δραστηριότητας (απουσία πτητικών ουσιών κατά την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία). Στα δείγματα αυτά δεν καταγράφηκε μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1-προπανόλης κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

Στη δεύτερη σειρά δειγμάτων ελέγχου πραγματοποιήθηκε ιχνηθέτηση αίματος εθελοντή αιμοδότη με συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00, 50,0, 100, 300 και 600 mg/dL αντίστοιχα, χωρίς να πραγματοποιηθεί ενοφθαλμισμός με αίμα απ πτώμα και ακολούθησε επώαση στις ίδιες συνθήκες όπως και τα προηγούμενα δείγματα. Και στη δεύτερη σειρά δειγμάτων ελέγχου δεν καταγράφηκε μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1-προπανόλης κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Και στις δύο σειρές δειγμάτων οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης που καταγράφηκαν ήταν από 0-1%.

β. Περιστατικό 2

Κλάσμα αίματος 200 μ L του Περιστατικού 2, αμέσως μετά τη πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροτομή, χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4,0 mL αίματος εθελοντή αιμοδότη που περιέχονταν σε σωληνάρια αιμοληψίας. Το αίμα του εθελοντή αιμοδότη είχε ιχνηθετηθεί προηγουμένως με αιθανόλη έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης να είναι: 0,00, 50,0, 100, και 200 mg/dL αντίστοιχα. Αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό πραγματοποιήθηκε ανάλυση κλάσματος 0,5 mL από κάθε



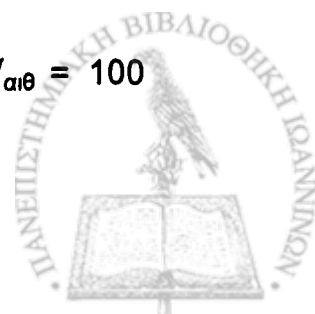
δείγμα με αέρια χρωματογραφία (ημέρα 0). Τα σωληνάρια πωματίστηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατά την ημέρα 1, 3, 6, 10 και 17, αντίστοιχα, γινόταν δειγματοληψία κλάσματος αίματος 0,5 mL από κάθε σωληνάριο για να αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία, επαναπωματισμός και συνέχιση της επώασης.

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τη συγκέντρωση της αιθανόλης. Σε όλα τα ενοφθαλμισμένα, με αίμα του Περιστατικού 2, δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, καταγράφηκε παραγωγή αιθανόλης. Την 1^η ημέρα της επώασης καταγράφηκε μικρή πτώση στη συγκέντρωση της αιθανόλης. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της αιθανόλης καταγράφηκαν την 6^η ημέρα της επώασης όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 0,00 mg/dL και 100 mg/dL, αντίστοιχα, την 10^η ημέρα της επώασης όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 50,0 mg/dL και την 17^η ημέρα της επώασης όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 200 mg/dL. Η μέγιστη αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης ήταν:

- 41,5 mg/dL (783%), από 5,3 mg/dL σε 46,8 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 0,00 mg/dL,
- 42,0 mg/dL (82,7%), από 50,8 mg/dL σε 92,8 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 50,0 mg/dL,
- 51,6 mg/dL (50,5%), από 102 mg/dL σε 154 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 100 mg/dL και
- 56,0 mg/dL (25,6%), από 219 mg/dL σε 375 mg/dL, όταν η $C^{IXV}_{αιθ}$ ήταν 200 mg/dL.

Στον Πίνακα 30 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τη συγκέντρωση της 1-προπανόλης. Η συγκέντρωση της 1-προπανόλης παρουσίασε μικρή σταδιακή αύξηση όλες τις ημέρες της επώασης. Η μέγιστη αύξηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης ήταν:

- 0,20 mg/dL (200%), από 0,10 mg/dL σε 0,30 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 0,00$ mg/dL,
- 1,00 mg/dL (1000%), από 0,10 mg/dL σε 1,10 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 50,0$ mg/dL,
- 0,60 mg/dL (600%), από 0,10 mg/dL σε 0,70 mg/dL, για $C^{IXV}_{αιθ} = 100$ mg/dL και



ΠΙΝΑΚΑΣ 29

Συγκεντρώσεις αιθανόλης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης (C_{ixv}), μετά τον ενοφθαλμισμό του με αίμα του Περιστατικού 2, κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

C_{ixv} (mg/dL)	0,00	50,0	100	200
Ημέρες	Συγκεντρώσεις αιθανόλης (mg/dL)			
0	5,30	50,8	102	219
1	2,40	47,3	95,5	215
3	43,9	88,1	153	232
6	46,8	92,7	154	270
10	46,0	92,8	149	271
17	36,9	90,7	134	275



ΠΙΝΑΚΑΣ 30

Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν σε αίμα εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αιθανόλης (C_{iXV}), μετά τόν ένοφθαλμισμό του με αίμα του Περιστατικού 2, κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατά τις αντίστοιχες ημέρες της επώασης.

C_{iXV} (mg/dL)	0,00	50,0	100	200
Ημέρες	Συγκεντρώσεις 1-προπανόλης (mg/dL)			
0	0,10	0,10	0,10	0,10
1	0,10	0,20	0,20	0,30
3	0,20	0,30	0,60	0,40
6	0,20	0,40	0,50	0,80
10	0,20	0,70	0,70	0,70
17	0,30	1,10	0,70	0,90



- 0,80 mg/dL (800%), από 0,10 mg/dL σε 0,90 mg/dL, για $C^{IX}_{αιθ} = 200$ mg/dL.

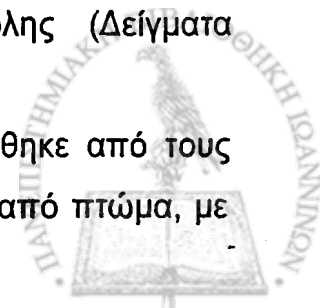
Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεσή μας ότι η παραγωγή αιθανόλης στο αίμα εθελοντή αιμοδότη κατά τον ενοφθαλμισμό με το επιλεγέν αίμα του Περιστατικού 2 οφειλόταν στο μικροβιακό φορτίο του δείγματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε δύο σειρές δειγμάτων ελέγχου.

Στην πρώτη σειρά δειγμάτων ελέγχου πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετημένου με συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00, 50,0, 100 και 200 mg/dL αντίστοιχα, με αίμα από πτώμα που δεν παρουσίαζε ενδείξεις μικροβιακής δραστηριότητας (απουσία πτητικών ουσιών κατά την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία). Στα δείγματα αυτά δεν καταγράφηκε μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1-προπανόλης κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

Στη δεύτερη σειρά δειγμάτων ελέγχου πραγματοποιήθηκε ιχνηθέτηση αίματος εθελοντή αιμοδότη με συγκεντρώσεις αιθανόλης 0,00, 50,0, 100 και 200 mg/dL αντίστοιχα, χωρίς να πραγματοποιηθεί ενοφθαλμισμός με αίμα από πτώμα και ακολούθησε επώαση στις ίδιες συνθήκες όπως και τα προηγούμενα δείγματα. Και στη δεύτερη σειρά δειγμάτων ελέγχου δεν καταγράφηκε μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1-προπανόλης κατά την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Και στις δύο σειρές δειγμάτων οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης που καταγράφηκαν ήταν από 0-1%.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Κατά τον ενοφθαλμισμό αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα που ελήφθηκε από πτώμα και είχε ενδείξεις παρουσίας μικροβιακού φορτίου, καταγράφηκε παραγωγή αιθανόλης και 1-προπανόλης.
- Κατά τον ενοφθαλμισμό αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα που ελήφθηκε από πτώμα που δεν είχε ενδείξεις παρουσίας μικροβιακού φορτίου, δεν καταγράφηκε παραγωγή αιθανόλης ή/και 1-προπανόλης (Δείγματα Ελέγχου, Σειρά 1).
- Η παραγωγή της αιθανόλης στα δείγματα πραγματοποιήθηκε από τους μικροοργανισμούς που υπήρχαν στο αίμα, που ελήφθηκε από πτώμα, με



το οποίο πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός, και όχι από μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να επιμολύνουν το δείγμα από το περιβάλλον (Δείγματα Ελέγχου, Σειρά 2).

3.6.3. Ποσοτική συσχέτιση της παραγόμενης αιθανόλης και 1-προπανόλης.

Κατά την ανάλυση ρουτίνας δειγμάτων αίματος που προέρχονται από πτώματα, οι παράμετροι που είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ακρίβεια είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης ($C_{αιθ}$) και η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ($C_{1προπ}$) που έχει το αίμα κατά την ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή. Τα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη (παρουσία ή απουσία αιθανόλης) που επιμολύνθηκαν με αίμα από τα Περιστατικά 1 και 2, κατασκευάστηκαν σαν «πρότυπα» αίματος που μπορεί να συλλεχθεί από πτώμα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Απώτερη επιθυμία μας ήταν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της 1-προπανόλης, κατά το πείραμα ενοφθαλμισμού, να μας οδηγήσουν στην εξαγωγή μιας ποσοτικής σχέσης μεταξύ τους, που θα επέτρεπε την εκτίμηση ή και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στο αίμα κατά τη στιγμή του θανάτου.

α. Περιστατικό 1

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος ενοφθαλμισμού αίματος εθελοντή αιμοδότη, για το Περιστατικό 1 (που παρουσιάζονται στους Πίνακες 27 και 28), οδήγησε στην εξαγωγή της αναλογίας (1). Στην αναλογία (1) περιλαμβάνονται: η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης, C_0 , στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση την ημέρα 0), η συγκέντρωση της αιθανόλης, $C_{αιθ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση αιθανόλης την αντίστοιχη ημέρα της επώασης), η αρχική συγκέντρωση της 1-προπανόλης, $C^0_{1προπ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση την ημέρα 0) και η συγκέντρωση της 1-προπανόλης, $C_{1προπ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση 1-προπανόλης την αντίστοιχη ημέρα της επώασης):

$$(C_{αιθ} - C_0) / C_{αιθ} = (C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) / f \quad (1)$$



Η παράμετρος f αποτελεί τον συντελεστή αναλογίας στην σχέση (1), που μπορεί να προσδιοριστεί από την αναλογία (1) και τις τιμές των $C_{αιθ}$, C_0 , $C^0_{1προπ}$, και $C_{1προπ}$ που παρουσιάζονται στους Πίνακες 27 και 28. Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται οι τιμές που προσδιορίζονται με αυτόν τον τρόπο για τον συντελεστή f .

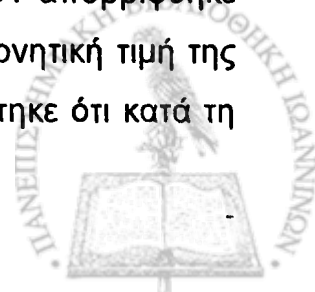
Η επίλυση της αναλογίας (1) ως προς C_0 οδηγεί στην εξαγωγή της σχέσης (2):

$$C_0 = C_{αιθ} (1 - (C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) / f) \quad (2)$$

Από την εξίσωση (2) υπολογίστηκαν οι τιμές C_0 , για το πείραμα του ενοφθαλμισμού, με την χρήση του μέσου όρου των τιμών f που αντιστοιχούσαν στην 6^η, στην 10^η και στην 17^η ημέρα της επώασης (χρονικό διάστημα που παρατηρήθηκε η παραγωγή της αιθανόλης) για κάθε ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης, αντίστοιχα (0,61 για $C^{XV}_{αιθ}=0,00$ mg/dL, 2,55 για $C^{XV}_{αιθ}=50,0$ mg/dL, 4,26 για $C^{XV}_{αιθ}=100$ mg/dL, 23 για $C^{XV}_{αιθ}=300$ mg/dL και 38 για $C^{XV}_{αιθ}=600$ mg/dL). Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται οι τιμές C_0 , για κάθε ημέρα της επώασης, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις της αιθανόλης, αντίστοιχα.

Οι τιμές C_0 που υπολογίστηκαν με αυτόν τον τρόπο προσέγγιζαν ικανοποιητικά τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις αιθανόλης την ημέρα 0 μετά την ιχνηθέτηση και τον ενοφθαλμισμό με το αίμα του Περιστατικού 1.

Στη συνέχεια προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου (C_0) στο αίμα που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό, εφαρμόστηκε η εξίσωση (2) ως εξής: Οι συγκεντρώσεις $C_{αιθ}$ και $C_{1προπ}$ ήταν αυτές που προσδιορίστηκαν στην πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροτομή. Η $C^0_{1προπ}$ θεωρήθηκε μηδενική κατά τη στιγμή του θανάτου. Η τιμή του συντελεστή που χρησιμοποιήθηκε ήταν $f=3,41$, ο μέσος όρος των τιμών 2,55 και 4,26. Οι τιμές των συντελεστών 23 και 38, που προέκυψαν στο πείραμα του ενοφθαλμισμού για τις πολύ υψηλές ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, 300 mg/dL και 600 g/dL αντίστοιχα, δεν εφαρμόστηκαν στο συγκεκριμένο αίμα, όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 18,8 mg/dL. Η τιμή του συντελεστή $f=0,61$ απορρίφθηκε γιατί κατά την εφαρμογή του στην εξίσωση (2) οδήγησε σε αρνητική τιμή της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε ότι κατά τη στιγμή του θανάτου η συγκέντρωση της αιθανόλης.



ΠΙΝΑΚΑΣ 31

Παράμετροι που αφορούν στην ποσοτική συσχέτιση αιθανόλης και 1-προπανόλης όπως προέκυψαν για το Περιστατικό 1.

Ημέρες		1	3	6	10	17
C_{ixv} (mg/dL) 0,00	f	-	-	0,72	0,61	0,51
	Μέσος όρος f	0,61				
C_0^{ixv} (mg/dL) 0,70	C_o (mg/dL)	-	0,20	-	0,50	4,40
	f	-	-	2,59	2,51	2,56
C_{ixv} (mg/dL) 50,0	Μέσος όρος f	2,55				
	C_0^{ixv} (mg/dL) 54,0	-	-	53,7	54,4	53,9
C_{ixv} (mg/dL) 100	f	-	-	4,43	4,24	4,10
	Μέσος όρος f	4,26				
C_0^{ixv} (mg/dL) 108	C_o (mg/dL)	-	99,4	107	108	110
	f	-	-	33,3	16,7	18,0
C_{ixv} (mg/dL) 300	Μέσος όρος f	23				
	C_0^{ixv} (mg/dL) 331	-	315	321	345	340
C_{ixv} (mg/dL) 600	f	-	11,1	52,2	34,3	27,4
	Μέσος όρος f	38				
C_0^{ixv} (mg/dL) 627	C_o (mg/dL)	-	635	611	635	648

C_{ixv} : Ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης

C_0^{ixv} : Μετρηθείσα συγκέντρωση αιθανόλης κατά την ημέρα 0

C_o : Η συγκέντρωση της αιθανόλης που υπολογίστηκε από τη σχέση (2)



ήταν 5,00 mg/dL. Η υπολογισθείσα τιμή της συγκέντρωσης ήταν πολύ μικρή και αυτό πρακτικά σημαίνει πως στο συγκεκριμένο πτώμα (Περιστατικό 1) όλη η ποσότητα της αιθανόλης που μετρήθηκε στο αίμα, μετά τη νεκροτομή, προέρχονταν αποκλειστικά από μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή.

β. Περιστατικό 2

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος ενοφθαλμισμού για το Περιστατικό 2 (που παρουσιάζονται στους Πίνακες 29 και 30) οδήγησε στην εξαγωγή της αναλογίας (3). Στην αναλογία (3) περιλαμβάνονται: η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης, C_0 , στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση την ημέρα 0), η συγκέντρωση της αιθανόλης, $C_{αιθ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση αιθανόλης την αντίστοιχη ημέρα της επώασης), η αρχική συγκέντρωση της 1-προπανόλης, $C^0_{1προπ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση την ημέρα 0) και η συγκέντρωση της 1-προπανόλης, $C_{1προπ}$, στο δείγμα αίματος (συγκέντρωση 1-προπανόλης την αντίστοιχη ημέρα της επώασης):

$$(C_{αιθ} - C_0) / C_0 = (C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) / f \quad (3)$$

Η παράμετρος f αποτελεί τον συντελεστή αναλογίας στην σχέση (3), που μπορεί να προσδιοριστεί από την αναλογία (3) και τις τιμές των $C_{αιθ}$, C_0 , $C^0_{1προπ}$, και $C_{1προπ}$ που παρουσιάζονται στους Πίνακες 29 και 30. Στον Πίνακα 32 παρουσιάζονται οι τιμές του συντελεστή f .

Η επίλυση της αναλογίας (3) ως προς C_0 οδηγεί στην εξαγωγή της σχέσης (4):

$$C_0 = C_{αιθ} * f / ((C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) + f) \quad (4)$$

Από την εξίσωση (4) υπολογίστηκαν οι τιμές C_0 , για το πείραμα του ενοφθαλμισμού, με την χρήση του μέσου όρου των τιμών f που αντιστοιχούσαν στην 3^η, στην 6^η και στην 10^η ημέρα της επώασης (χρονικό διάστημα που παρατηρήθηκε η παραγωγή της αιθανόλης) για κάθε ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης, αντίστοιχα (0,013 για $C^{XV}_{αιθ}=0,00$ mg/dL, 0,45 για $C^{XV}_{αιθ}=50,0$ mg/dL, 1,03 για $C^{XV}_{αιθ}=100$ mg/dL και 3,45 για $C^{XV}_{αιθ}=200$ mg/dL). Στον Πίνακα 32 παρουσιάζονται οι τιμές C_0 , για κάθε ημέρα της επώασης, για όλες τις ιχνηθετημένες συγκεντρώσεις της αιθανόλης, αντίστοιχα.



ΠΙΝΑΚΑΣ 32

Παράμετροι που αφορούν στην ποσοτική συσχέτιση αιθανόλης και 1-προπανόλης όπως προέκυψαν για το Περιστατικό 2.

Ημέρες		1	3	6	10	17
C_{ixv} (mg/dL) 0,00	f	-	0,014	0,013	0,013	0,033
	Μέσος όρος f	0,013				
C_0^{ixv} (mg/dL) 5,30	C_o (mg/dL)	2,40	5,00	5,40	5,30	2,2
	f	-	0,27	0,36	0,723	1,27
C_{ixv} (mg/dL) 50,0	Μέσος όρος f	0,45				
	C_o (mg/dL)	38,7	61,0	55,6	39,8	28,1
C_{ixv} (mg/dL) 100	f	-	0,997	0,791	1,30	1,95
	Μέσος όρος f	1,03				
C_0^{ixv} (mg/dL) 102	C_o (mg/dL)	87,0	103	111	94,3	84,4
	f	-	4,89	2,95	2,51	3,12
C_{ixv} (mg/dL) 200	Μέσος όρος f	3,45				
	C_o (mg/dL)	203	213	225	231	223

C_{ixv} : Ιχνηθετημένη συγκέντρωση αιθανόλης

C_0^{ixv} : Μετρηθείσα συγκέντρωση αιθανόλης κατά την ημέρα 0

C_o : Η συγκέντρωση της αιθανόλης που υπολογίστηκε από τη σχέση (4)



Οι τιμές C_0 που υπολογίστηκαν με αυτόν τον τρόπο προσέγγιζαν ικανοποιητικά τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις αιθανόλης την ημέρα 0 μετά την ιχνηθέτηση και τον ενοφθαλμισμό με το αίμα του Περιστατικού 2.

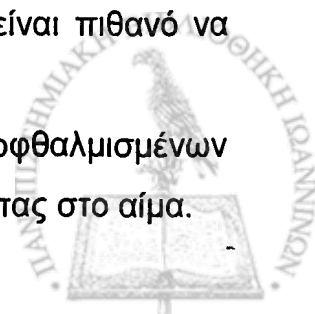
Στην συνέχεια προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου (C_0) στο αίμα του Περιστατικού 2, εφαρμόστηκε η εξίσωση (4) ως εξής: Οι συγκεντρώσεις $C_{αιθ}$ και $C_{1προπ}$ ήταν αυτές που προσδιορίστηκαν στην πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση μετά τη νεκροτομή. Η $C_{1προπ}^0$ θεωρήθηκε μηδενική κατά τη στιγμή του θανάτου. Η τιμή του συντελεστή που χρησιμοποιήθηκε ήταν $f=2,24$, ο μέσος όρος των τιμών 1,03 και 3,45 (για μετρούμενες συγκεντρώσεις 100 mg/dL και 200 mg/dL, αντίστοιχα). Οι τιμές των συντελεστών 0,013 και 0,45 προέκυψαν στο πείραμα του ενοφθαλμισμού για χαμηλές μετρούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (0,00 mg/dL και 50,0 mg/dL, αντίστοιχα) και συνεπώς δεν εφαρμόστηκαν στο συγκεκριμένο αίμα, όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 112 mg/dL. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε ότι κατά τη στιγμή του θανάτου η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 26,7 mg/dL.

Το αποτέλεσμα υποδηλώνει πως στο συγκεκριμένο αίμα που η μετρηθείσα συγκέντρωση της αιθανόλης, μετά τη νεκροτομή, ήταν 112 mg/dL, ένα μικρό ποσοστό της αιθανόλης οφείλονταν σε προθανάτια κατάποση, 24%, (26,7 mg/dL), ενώ το 76%, (84,5 mg/dL) προέρχονταν από μικροβιακή παραγωγή στο πτώμα.

Τα ευρήματα αυτά, δεδομένου ότι το αίμα του Περιστατικού 2 προερχόταν από πτώμα με εκτεταμένες σηπτικές εξεργασίες που είχε υψηλή συγκέντρωση πτητικών κάποιο ποσοστό της μετρηθείσας αιθανόλης μπορεί να οφειλόταν σε μεταθανάτια παραγωγή. Από την άλλη, η υψηλή προσδιορισθείσα συγκέντρωση της αιθανόλης δεν απέκλειε το ενδεχόμενο της κατάποσης αιθανόλης “εν ζωή”.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Ο ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα, που είναι πιθανό να έχει μικροβιακό φορτίο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «πρότυπο» μελέτης της παραγωγής αιθανόλης και της 1-προπανόλης όπως είναι πιθανό να έχει εξελιχθεί στο συγκεκριμένο πτώμα.
- Η παραγωγή της 1-προπανόλης κατά την επώαση των ενοφθαλμισμένων δειγμάτων αποτελεί βέβαιο δείκτη μικροβιακής δραστηριότητας στο αίμα.



- Οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης αιθανόλης και 1-προπανόλης που προσδιορίζονται σε δείγμα αίματος, που προέρχεται από πτώμα, μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους και να οδηγήσουν στην εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε διάφορα βιολογικά υλικά αποτελεί την πιο συχνή ανάλυση που διενεργείται στα διαπιστευμένα εργαστήρια Τοξικολογίας. Η αιθανόλη, εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών, είναι όμως δυνατόν, να παραχθεί μεταθανάτια από τη δράση των μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη (αλκοολική ζύμωση). Επίσης είναι δυνατόν να παραχθεί στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία. Ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης -κατάποση από το άτομο "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή- και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου αποτελεί πρόβλημα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία, δεδομένου ότι, η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετράται εργαστηριακά στα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα κλπ) χρησιμοποιείται σαν αποδεικτικό στοιχείο σε ποινικά και αστικά δικαστήρια.

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει τρόπος διάκρισης της αιθανόλης που προέρχεται από κατάποση "εν ζωή", από την αιθανόλη που παράγεται μεταθανάτια λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας. Έχει υποστηριχθεί πως η παρουσία άλλων πτητικών ουσιών και κυρίως της 1-προπανόλης, στα βιολογικά υλικά που αναλύονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης, αποτελεί ένδειξη μικροβιακής δραστηριότητας και κατ' επέκταση μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης σε αυτά (Nanikawa et al. 1974, Nanikawa 1982, Zumwalt et al. 1982, Caplan et al. 1990, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Gilliland et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Hadley et al. 2003, Johnson et al. 2004, Moriya et al. 2004, Lewis et al. 2004). Η εκδοχή αυτή όμως αμφισβητήθηκε, αφού στις σχετικές εργασίες, που αφορούσαν βιολογικά υλικά που ελήφθησαν μεταθανάτια, δεν αναφέρονταν ποσοτικά δεδομένα για τα άλλα πτητικά, εκτός της αιθανόλης (Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Johnson et al. 2004). Επίσης, είναι γνωστό ότι, πολλά από τα πτητικά που ανιχνεύονται μεταθανάτια παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό ως προϊόντα φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, ή εισέρχονται στον οργανισμό μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών (Logan et al. 1994, Wu et al. 1995, Jones et al. 1995, Haffner et al.



1996, Pounder et al. 1998, Smialek et al. 1998, Zuba et al. 1998, Kalapos 2003).

Προσδιορισμός αιθανόλης και άλλων πτητικών ουσιών στο αίμα:

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των πτητικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε διάφορα βιολογικά υλικά που ελήφθησαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών στα βιολογικά υλικά ήταν η αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης, η οποία αποτελεί την μέθοδο αναφοράς για την διεξαγωγή σχετικών αναλύσεων (Tagliaro et al. 1992).

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή των παραμέτρων λειτουργίας του χρωματογράφου, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών που ανιχνεύονται συνήθως στα διάφορα βιολογικά υλικά (Tangerman 1997). Η διάρκεια του χρωματογραφήματος ήταν 20 min και επέτρεπε τον πλήρη διαχωρισμό των παρακάτω πτητικών ουσιών: αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη, οξικός αιθυλεστέρας, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη, βουτανόνη, ισοαμυλική αλκοόλη, αμμωνία και ακετονιτρίλιο (ως εσωτερικό πρότυπο). Οι παραπάνω πτητικές ουσίες επιλέχθηκαν για ανάλυση είτε γιατί έχουν αναφερθεί ως προϊόντα σήψης (Nanikawa et al. 1974, Corry 1978, Zumwalt et al. 1982, Caplan et al. 1990, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Gilliland et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Hadley et al. 2003, Johnson et al. 2004, Moriya et al. 2004, Lewis et al. 2004) είτε γιατί αποτελούν προϊόντα φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών (Logan et al. 1994, Wu et al. 1995, Jones et al. 1995, Haffner et al. 1996, Pounder et al. 1998, Smialek et al. 1998, Zuba et al. 1998, Kalapos 2003).

Στα βιολογικά υλικά που μελετήθηκαν ανιχνεύτηκαν ποιοτικά οι πτητικές ουσίες: αμμωνία, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόνη, 2-βουτανόλη, μεθανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και 1-βουτανόλη. Σε κανένα βιολογικό υλικό δεν ανιχνεύτηκε παρουσία φορμαλδεΐδης παρόλο που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Corry 1978).



Η αμμωνία ανιχνεύτηκε σε όλα τα βιολογικά υλικά και η παρουσία της αποδόθηκε στην διάσταση του θειικού αμμωνίου που προστέθηκε στα δείγματα που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία προκειμένου να αυξηθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Ο οξικός αιθυλεστέρας ανιχνεύτηκε σε όλα τα βιολογικά υλικά που υπήρχε αιθανόλη. Η παρουσία μεθανόλης στον οργανισμό έχει παρατηρηθεί τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις (Haffner 1996) όσο και μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών στα οποία και περιέχεται (Zuba 2001). Τέλος, η παρουσία των πτητικών ουσιών βουτανόνη, 2-βουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και 1-βουτανόλη σε βιολογικά υλικά που λαμβάνονται από πτώματα έχει συνδεθεί με την ύπαρξη μικροβιακής δραστηριότητας σε αυτά (Corry 1978, Skopp 2004).

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο επειδή δεν αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον ανθρώπινο οργανισμό και, επιπλέον, δεν αποτελεί οργανικό προϊόν αποσύνθεσης μεταθανάτια (O'Neal et al. 1996b). Αναφέρεται ότι σε άλλα εργαστήρια χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο η 1-προπανόλη παρότι, αυτή έχει ταυτοποιηθεί ως προϊόν σήψης.

Σε όλα τα μεταθανάτια βιολογικά υλικά που αναλύθηκαν πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης. Οι πτητικές ουσίες που επιλέχθηκε να προσδιοριστούν ποσοτικά ήταν είτε προϊόντα μεταβολισμού της αιθανόλης (ακεταλδεΐδη) (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a; Skopp 2004, Lewis et al. 2004) είτε προϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη σήψη των πτωμάτων (1-προπανόλη) (Davis et al. 1972, Nanikawa et al. 1982, Kuhlman et al. 1991, Takayasu et al. 1995a, O'Neal et al. 1996a; Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004, Skopp 2004, Moriya et al. 2004) είτε προϊόντα μεταβολισμού στον ανθρώπινο οργανισμό που ανιχνεύονται και στα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια (2-προπανόλη, ακετόνη) (Davis et al. 1972, Kuhlman et al. 1991, Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Grellner et al. 1997, Smialek et al. 1998, Videira de Lima et al. 1999, Kalapos 2003, Lewis et al. 2004, Skopp 2004).



Ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων βιολογικών υλικών που αναλύθηκαν για την παρουσία αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών ήταν αίμα. Αναλύθηκαν συνολικά 195 δείγματα αίματος που ελήφθησαν, από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

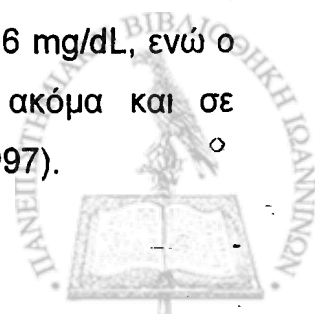
Το 84,1% των δειγμάτων αίματος που αναλύθηκαν είχε «μη ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης ($< 50,0 \text{ mg/dL}$), ενώ το 76,4% (149/195) είχε πολύ μικρή συγκέντρωση αιθανόλης ($C_{\text{αιθ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$). Τα δείγματα αίματος που είχαν $C_{\text{αιθ}} < 10,0 \text{ mg/dL}$, είχαν παράλληλα μη ανιχνεύσιμη ή πολύ μικρή συγκέντρωση των άλλων πτητικών που προσδιορίστηκαν. Συγκεκριμένα:

- το 98% των δειγμάτων αίματος (146/149) είχε $C_{\text{ακεταλ}} < 0,50 \text{ mg/dL}$, από τα οποία το 1,4% (2/146) είχε μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ακεταλδεϋδης,
- το 94% των δειγμάτων αίματος (140/149) είχε $C_{2\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$, από τα οποία το 45% (63/140) είχε μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση 2-προπανόλης,
- το 93% των δειγμάτων αίματος (138/149) είχε $C_{\text{ακετον}} < 0,50 \text{ mg/dL}$, από τα οποία κανένα δεν είχε μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ακετόνης και
- το 98% των δειγμάτων αίματος (146/149) είχε $C_{1\text{προπ}} < 0,10 \text{ mg/dL}$, από τα οποία το 98% (143/146) είχε μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση 1-προπανόλης.

Αξιοσημείωτο είναι πως μόνο σε ένα από τα 195 δείγματα αίματος η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν σε επίπεδα κάτω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, όπως επίσης ότι δεν βρέθηκε κανένα δείγμα αίματος που να είχε συγκέντρωση αιθανόλης $> 10,0 \text{ mg/dL}$ και να είχε ταυτόχρονα μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ακεταλδεϋδης, 1-προπανόλης και 2-προπανόλης.

Ακετόνη ανιχνεύτηκε σε ποικίλες συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα αίματος ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της αιθανόλης.

Στα δείγματα αίματος που είχαν $C_{\text{αιθ}} > 300 \text{ mg/dL}$ (3,6%), η συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα ($0,10 \text{ mg/dL}$ - $1,00 \text{ mg/dL}$), γεγονός που εξηγείται από το ότι η αλκοολική αφυδρογονάση, που μεταβολίζει την αιθανόλη προς ακεταλδεϋδη, κορέννυται όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα είναι μεγαλύτερη από 16 mg/dL , ενώ ο ρυθμός μεταβολισμού συνεχίζει να παραμένει σταθερός ακόμα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (Μιχαλοδημητράκης 1997).



Στα δείγματα αυτά η συγκέντρωση της 2-προπανόλης κυμάνθηκε σε χαμηλά ως μέτρια επίπεδα ($< 1,00 \text{ mg/dL}$), εκτός από μία περίπτωση όπου προσδιορίστηκε υψηλή συγκέντρωση ($1,00 \text{ mg/dL}$ - $10,0 \text{ mg/dL}$).

Η 1-προπανόλη ανιχνεύτηκε επίσης σε χαμηλές ($< 0,10 \text{ mg/dL}$) ή μέτριες συγκεντρώσεις ($0,10 \text{ mg/dL}$ - $3,00 \text{ mg/dL}$) σε όλα τα δείγματα αίματος που είχαν τοξική συγκέντρωση αιθανόλης.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα δείγματα αίματος με τοξική συγκέντρωση αιθανόλης δείχνουν ότι μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών "έν ζωή" είναι πολύ πιθανή η ανίχνευση στον ανθρώπινο οργανισμό και άλλων πτητικών ουσιών, όπως η ακεταλδεϋδη, η 1-προπανόλη και η 2-προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις τους όμως παραμένουν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα όσο μεγάλη και αν είναι η ποσότητα των αλκοολούχων ποτών που έχει καταναλωθεί.

Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αλκοολικούς, "έν ζωή", που είχαν υποστεί οξεία δηλητηρίαση από αιθανόλη, μετά την κατάποση αλκοολούχων ποτών, όπου οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στο αίμα ήταν για την ακεταλδεϋδη $\leq 0,60 \text{ mg/dL}$, για την 1-προπανόλη $\leq 0,10 \text{ mg/dL}$ και για την 2-προπανόλη $\leq 0,50 \text{ mg/dL}$ (Zuba et al. 2001).

Στην παρούσα μελέτη, στα δείγματα αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης από $10,0 \text{ mg/dL}$ ως 300 mg/dL οι συγκεντρώσεις των πτητικών που μετρήθηκαν ήταν ποικίλες.

Τα δείγματα αίματος ($24/195$, $2,3\%$) με «ένοχη» αλλά μη τοξική συγκέντρωση αιθανόλης ($50,0$ - 300 mg/dL) τα περισσότερα ($18/24$) είχαν σε ποσοστό 75% ($18/24$) μέτριες ως υψηλές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης ($0,10$ - $1,00 \text{ mg/dL}$), και σε ποσοστό 25% ($6/24$) είχαν πολύ υψηλή συγκέντρωση ακεταλδεϋδης ($> 1,00 \text{ mg/dL}$). Τα δείγματα αίματος ($15/195$, $7,7\%$) με «μη ένοχη» μέτρια συγκέντρωση αιθανόλης ($10,0$ - $50,0 \text{ mg/dL}$) είχαν όλα συγκέντρωση ακεταλδεϋδης που κυμάνθηκε σε μέτρια ή υψηλά επίπεδα ($> 0,10 \text{ mg/dL}$).

Το γεγονός ότι υπήρχαν δείγματα αίματος με μέτρια ή υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης που είχαν παράλληλα συγκέντρωση ακεταλδεϋδης ακόμα μεγαλύτερη και από τα επίπεδα ακεταλδεϋδης που καταγράφηκαν για τα δείγματα με τοξικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, υποδεικνύει ότι στα



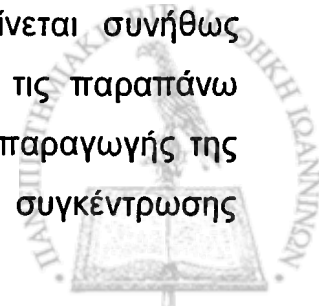
συγκεκριμένα δείγματα η προέλευση της ακεταλδεΐδης δεν πρέπει να οφείλονταν στο μεταβολισμό της αιθανόλης στον οργανισμό. Τα αυξημένα επίπεδα της ακεταλδεΐδης στις περιπτώσεις αυτές θεωρήθηκε αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας στα δείγματα. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι ακεταλδεΐδη παράγεται από μικροοργανισμούς που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη (Corry 1978, Gottschalk 1986).

Στα 4/24 δείγματα (17%) αίματος με «ένοχη» αλλά μη τοξική συγκέντρωση αιθανόλης (50,0-300 mg/dL), και στα 2/15 (13%) δείγματα αίματος με «μη ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης (10,0-50,0 mg/dL), οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης ήταν > 3,00 mg/dL και ξεπερνούσαν ακόμα και τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης (0,10-3,00 mg/dL) που καταγράφηκαν για τα δείγματα αίματος με τοξικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Οι παρατηρήσεις ότι στα δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν ≥ 300 mg/dL η συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν χαμηλή ή μέτρια (< 3,00 mg/dL), και ότι στα δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν χαμηλή (< 10,0 mg/dL) είτε δεν ανιχνεύτηκε 1-προπανόλη είτε η συγκέντρωσή της ήταν πολύ χαμηλή (< 0,10 mg/dL), οριοθετούν την τιμή της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης, 0,10 mg/dL, ως την ανώτερη συγκέντρωση 1-προπανόλης που μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια ότι προέρχεται από κατάποση αλκοολούχων ποτών.

Στα δείγματα αίματος που είχαν «ένοχη» αλλά μη τοξική συγκέντρωση αιθανόλης, όπως και στα δείγματα που είχαν «μη ένοχη» συγκέντρωση αιθανόλης (39/198, 20%) τα επίπεδα της 2-προπανόλης που ανιχνεύτηκαν εκτείνονταν σε όλα τα εύρη των συγκεντρώσεων που καθορίστηκαν, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων (90%) είχε επίπεδα 2-προπανόλης < 1,00 mg/dL.

Περαιτέρω ελέγχθηκαν τα δείγματα αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης από 20,0 mg/dL ως 100 mg/dL. Η επιλογή μελέτης των δειγμάτων με αυτό το εύρος συγκέντρωσης αιθανόλης, έγινε με το σκεπτικό ότι αφού η ποσότητα της μεταθανάτια παραγόμενης αιθανόλης κυμαίνεται συνήθως γύρω στα 40,0 mg/dL (Corry 1978), τότε σε δείγματα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις ήταν πιθανό το φαινόμενο της μεταθανάτια παραγωγής της αιθανόλης να έχει οδηγήσει σε προσδιορισμό «ένοχης» συγκέντρωσης



αιθανόλης, ενώ στην πραγματικότητα το άτομο μπορεί να μην είχε καταναλώσει τόση (ή και καθόλου) ποσότητα αιθανόλης "εν ζωή". Ενδεικτικό στοιχείο της ύπαρξης μικροβιακής δραστηριότητας και συνεπώς μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης στα δείγματα αποτέλεσε η εύρεση συγκέντρωσης 1-προπανόλης $> 0,10$ mg/dL, όπως προηγουμένως αιτιολογήθηκε.

Από τον έλεγχο προέκυψε ότι εννέα από τα 20 δείγματα αίματος (45%) με συγκέντρωση αιθανόλης από 20,0 mg/dL ως 100 mg/dL είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $> 0,10$ mg/dL, που κυμαίνονταν σε όλα τα εύρη των συγκεντρώσεων 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι σε ποσοστό 45% των δειγμάτων αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης 20,0-100 mg/dL υπάρχει η πιθανότητα μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης, που θα έχει σαν συνέπεια τον προσδιορισμό διαφορετικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα από την πραγματική που υπήρχε τη στιγμή του θανάτου.

Επειδή το ποσοστό των «ύποπτων» δειγμάτων αίματος, με συγκέντρωση αιθανόλης γύρω από την «ένοχη» συγκέντρωση, που προσδιορίστηκε με μόνο κριτήριο την συγκέντρωση της 1-προπανόλης ήταν πολύ μεγάλο, αποφασίστηκε να εισαχθούν και άλλοι «δείκτες» μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης. Οι «δείκτες» αυτοί ήταν οι συγκεντρώσεις στο αίμα της ακεταλδεϋδης σε επίπεδα $> 0,50$ mg/dL και της 2-προπανόλης σε επίπεδα $> 0,10$ mg/dL, σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης σε επίπεδα $> 0,10$ mg/dL.

Ελέγχθηκαν τα δείγματα αίματος με συγκέντρωση αιθανόλης από 10-300 mg/dL, ως προς τις συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν για τα παραπάνω πτητικά. Δεν ελέγχθηκαν τα δείγματα αίματος με μικρές συγκεντρώσεις αιθανόλης ($< 10,0$ mg/dL), αφού από νομικής απόψεως, οι συγκεντρώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν κανένα ενδιαφέρον, όπως και τα δείγματα αίματος με τοξικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (≥ 300 mg/dL), αφού σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις το πιο πιθανό ήταν η συγκέντρωση της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου να ήταν $> 50,0$ mg/dL, και η μεταθανάτια παραγωγή (αν έλαβε χώρα) να μη προκάλεσε μεγάλο σφάλμα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

Βρέθηκε ότι 8/39 (21%) δείγματα αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης 10,0-300 mg/dL, είχαν παράλληλα συγκέντρωση ακεταλδεϋδης $>$



0,50 mg/dL, συγκέντρωση 2-προπανόλης > 0,10 mg/dL και συγκέντρωση 1-προπανόλης > 0,10 mg/dL. Μετά από αναδρομή στις αντίστοιχες Ιατροδικαστικές εκθέσεις πιστοποιήθηκε ότι, αυτά τα οχτώ δείγματα αίματος προέρχονταν από πτώματα στα οποία βρίσκονταν σε εξέλιξη σηπτικές εξεργασίες κατά την διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής.

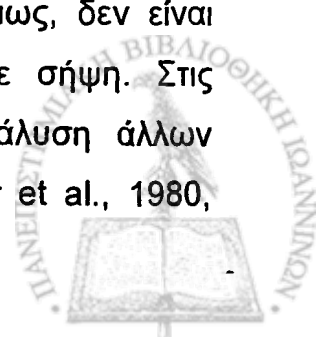
Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι στα δείγματα αίματος που έχουν συγκέντρωση αιθανόλης 10,0-300 mg/dL, το ποσοστό των δειγμάτων που υπάρχει πιθανότητα να έχει συμβεί μεταθανάτια παραγωγή είναι 21% (8/39).

Η χρήση ποσοτικών δεδομένων για πτητικές ουσίες που προσδιορίζονται σε μεταθανάτια βιολογικά υλικά, για την διερεύνηση της πιθανότητας να έχει συμβεί μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης στα δείγματα, πραγματοποιείται για πρώτη φορά στη μελέτη αυτή. Αν και η παρουσία των πτητικών σε δείγματα αίματος έχει θεωρηθεί κριτήριο μεταθανάτια παραγωγής αιθανόλης (Corry 1978, Zumwalt et al. 1982, Caplan et al. 1990, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Gilliland et al. 1993, Canfield et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Hadley et al. 2003, Johnson et al. 2004, Moriya et al. 2004, Lewis 2004), εντούτοις αυτό έχει στηριχθεί σε ποιοτικά δεδομένα και για αυτό έχει αμφισβητηθεί (Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Johnson et al. 2004).

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης και της 2-προπανόλης παράλληλα με την αιθανόλη κατά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων αίματος προσφέρει το πλεονέκτημα ότι με την ίδια, ουσιαστικά, απλή ανάλυση των δειγμάτων προσδιορίζεται τόσο η συγκέντρωση της αιθανόλης, όσο και των άλλων πτητικών, και προκύπτουν στοιχεία που υποστηρίζουν την πιθανότητα μεταθανάτια παραγωγής αιθανόλης στο δείγμα.

Προσδιορισμός αιθανόλης και άλλων πτητικών ουσιών σε άλλα βιολογικά υλικά:

Με βάση την ισχύουσα νομοθεσία το αίμα είναι το βιολογικό υλικό που αναλύεται για τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Το αίμα όμως, δεν είναι πάντα διαθέσιμο ιδιαίτερα όταν πρόκειται για πτώματα σε σήψη. Στις περιπτώσεις αυτές, έχει προταθεί η δειγματοληψία και ανάλυση άλλων βιολογικών υλικών, όπως ούρα, υαλοειδές υγρό κλπ (Backer et al., 1980,



Winek et al., 1981, Budd 1982, Nanikawa et al., 1982, Jenkins et al., 1995, Ohshima et al., 1997, Garriott 2003, Jones et al., 2003, Johnson et al., 2004).

Ο προσδιορισμός διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης σε διαφορετικά βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος -σε συνδυασμό με την παρουσία και άλλων πτητικών ουσιών στα δείγματα- έχει χρησιμοποιηθεί σαν κριτήριο μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης (Zumwalt et al. 1982, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Lewis et al. 2004). Το κριτήριο όμως αυτό έχει αμφισβητηθεί (O'Neal et al. 1996a, Johnson et al. 2004) ἐπειδή αφενός στις σχετικές μελέτες δεν αναφέρονταν τα επίπεδα των άλλων πτητικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα και αφετέρου έχουν προσδιοριστεί διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης σε διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος είτε λόγω μεταθανάτιας ανακατανομή της αιθανόλης (Plueckhahn et al. 1967, Corry 1978, Chikasue et al. 1988, Pounder et al. 1991, Shepherd et al. 1992, Winek et al. 1995, Pelissier-Alicot et al. 2004, Skopp 2004) είτε λόγω του γεγονότος ότι κατά τη στιγμή του θανάτου η αιθανόλη βρισκόταν στο στάδιο της απορρόφησης ή της απέκκρισης (Briglia et al. 1992, Sylvester et al. 1998).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, κατά την ανάλυση των βιολογικών υλικών, έδειξαν ότι τα επίπεδα της αιθανόλης παρουσίαζαν διακυμάνσεις στα διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος, και οι μεγαλύτερες διαφορές στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης παρατηρήθηκαν μεταξύ αίματος και ούρων, και μεταξύ αίματος και στομαχικού περιεχομένου. Διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν και στα επίπεδα της 1-προπανόλης που καταγράφηκαν για τα διάφορα βιολογικά υλικά του ίδιου πτώματος, και ιδιαίτερα μεταξύ αίματος και ούρων και μεταξύ αίματος και στομαχικού περιεχομένου.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα της αιθανόλης μεταξύ αίματος και ούρων του ίδιου πτώματος ήταν πιθανό να οφείλονταν στη φάση μεταβολισμού της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου αναφέρθηκαν μεγάλες διαφορές στις περιπτώσεις που η αιθανόλη ήταν στη φάση της απορρόφησης ($C_{\text{αιθ-αίματος}} > C_{\text{αιθ-ούρων}}$), όπως και στις περιπτώσεις όπου η αιθανόλη ήταν στη φάση της απέκκρισης ($C_{\text{αιθ-αίματος}} < C_{\text{αιθ-ούρων}}$) κατά τη στιγμή του θανάτου (Briglia et al. 1992, Sylvester et al. 1998).



Ενδιαφέρον προκάλεσε η παρατήρηση ότι 44% (21/48) και 54% (26/48) των δειγμάτων ούρων είχαν ακεταλδεΐδη και 1-προπανόλη αντίστοιχα, κάτω από το όριο ανίχνευσης τη μεθόδου. Αυτό υποδεικνύει ότι στα συγκεκριμένα δείγματα δεν ήταν πιθανή η ύπαρξη μικροβιακού φορτίου.

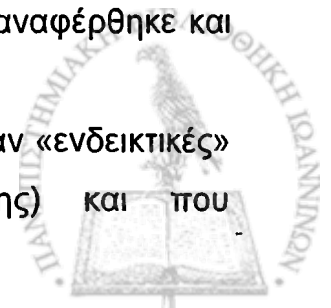
Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι τα ούρα δεν αποτελούν ευνοϊκό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη των πτωμάτων (Fine 1965, Jones 2003). Επομένως, είναι πιθανό να έχει συμβεί μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης στο αίμα ενός πτώματος, ενώ στα ούρα του να μην έχει συμβεί.

Για τα περιστατικά που η συγκέντρωση της 1-προπανόλης στα ούρα ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωσή της στο αίμα (94%) υπήρχαν τα ενδεχόμενα είτε της εντονότερης μικροβιακής δραστηριότητας στα ούρα, λόγω μεταθανάτιας επιμόλυνσής τους, ή της δράσης των μικροβίων στα ούρα εξαιτίας λοιμώξεων στο άτομο "εν ζωή". Η υπόθεση αυτή χρειάζεται, βέβαια, περαιτέρω διερεύνηση σε περιστατικά που θα είναι γνωστή η παθολογία του ατόμου "εν ζωή", οπότε θα μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίδραση των λοιμώξεων στα επίπεδα των πτητικών ουσιών που προσδιορίζονται μεταθανάτια.

Επίσης οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της 2-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στα ούρα ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες που προσδιορίστηκαν στο αίμα. Το αποτέλεσμα αυτό θεωρήθηκε αναμενόμενο αφού τα ούρα, όπως προαναφέρθηκε, δεν αποτελούν ευνοϊκό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Fine 1965, Jones 2003). Παραγωγή αιθανόλης στα ούρα, έχει παρατηρηθεί μόνο παρουσία μικροοργανισμών και μεγάλης συγκέντρωσης γλυκόζης, μετά από επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Saady et al. 1993, Helander et al. 1995, Sulkowski et al. 1995).

Ο προσδιορισμός μεγαλύτερης συγκέντρωσης αιθανόλης στο στομαχικό περιεχόμενο από ότι στο αίμα αποδόθηκε είτε σε κατάποση αιθανόλης, που δεν είχε ακόμη απορροφηθεί κατά τη στιγμή του θανάτου, είτε στη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης στο στομαχικό περιεχόμενο λόγω επιμόλυνσής του από την μικροχλωρίδα του εντέρου, όπως αναφέρθηκε και σε άλλες εργασίες (Corry, 1978, Garriott 2003).

Οι συγκεντρώσεις των άλλων πτητικών που θεωρήθηκαν «ενδεικτικές» των σηπτικών εξεργασιών (κυρίως της 1-προπανόλης) και που



προσδιορίστηκαν στα βιολογικά υλικά παρουσίαζαν διακυμάνσεις σε σχέση με το αίμα, υποδηλώνοντας ότι η μικροβιακή δραστηριότητα σε αυτά ήταν διαφορετική από ότι στο αίμα. Συνεπώς, η δειγματοληψία και ανάλυση διαφορετικών βιολογικών υλικών από το ίδιο πτώμα, δεν μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής διαδικασία για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα, μέσω της χρήσης των αντίστοιχων λόγων (συγκέντρωση αιθανόλης στα βιολογικά υλικά προς συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα) που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Η ανάλυση άλλων βιολογικών υλικών μπορεί να πραγματοποιηθεί προκειμένου να υποστηρίξει την ύπαρξη και έκταση των σηπτικών εξεργασιών στο πτώμα, μετά τον προσδιορισμό των επιπέδων των άλλων πτητικών ουσιών (1-προπανόλης, ακεταλδεϋδης και 2-προπανόλης), όπως καθορίστηκαν για το αίμα.

Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης των βιολογικών στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών:

Εξαιτίας της "ιδιαιτερότητας" στο καθεστώς μεταφοράς και αποθήκευσης μεταθανάτιων βιολογικών υλικών που ισχύει σε ορισμένες περιπτώσεις, διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης στη συγκέντρωση της αιθανόλης, της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης, σε δείγματα βιολογικών υλικών που προέρχονταν από πτώματα σε διάφορα στάδια σηπτικών εξεργασιών.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών στα βιολογικά υλικά ήταν συνάρτηση της έκτασης των σηπτικών εξεργασιών στο πτώμα, οι οποίες, προφανώς είχαν επηρεάσει το μικροβιακό φορτίο που έφεραν τα δείγματα. Η μείωση στη συγκέντρωση της αιθανόλης παρατηρήθηκε σε δείγματα που προέρχονταν από πτώματα χωρίς εμφανείς σηπτικές εξεργασίες και αποδόθηκε σε οξείδωση ή εξάτμιση. Οι μεταβολές στα επίπεδα της αιθανόλης που οφείλονταν σε μείωση της συγκέντρωσής της ήταν μικρότερες, κατά απόλυτη τιμή, από τις παρατηρηθείσες μεταβολές που οφείλονταν σε αύξηση της συγκέντρωσής της λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας.



Κατά τη μελέτη προέκυψε επίσης ότι, η συντήρηση των βιολογικών υλικών στους 4°C, απουσία συντηρητικού, μπορούσε να διασφαλίσει την ακεραιότητα των δειγμάτων μόνο για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Για τα δείγματα που προέρχονταν από πτώματα σε σήψη η συντήρηση στους 4°C, απουσία συντηρητικού, ήταν ανεπαρκής, αφού οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

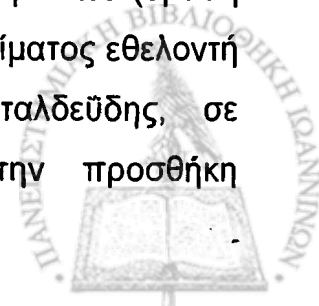
Η συντήρηση των δειγμάτων στους 4°C για το μέγιστο χρονικό διάστημα των 90 ημερών που απαιτεί ο νόμος, οδήγησε σε ποικίλες μεταβολές των συγκεντρώσεων τόσο της αιθανόλης όσο και των άλλων πτητικών ουσιών.

Η παραμονή από την άλλη των δειγμάτων αίματος και ούρων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οδήγησε, πολύ νωρίτερα, σε αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών, ιδιαίτερα στα δείγματα που προέρχονταν από πτώματα σε σήψη.

Σε μεταθανάτια βιολογικά υλικά, μετά τη δειγματοληψία, έχει παρατηρηθεί μεταβολή των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την επώασή τους σε διάφορες θερμοκρασίες, η οποία αποδόθηκε σε εξάτμιση ή οξειδωση ή στη μικροβιακή δραστηριότητα (Corry 1978, Chang et al. 1984, Nanikawa et al. 1988, Chang et al., 1989, Sulkowski et al. 1995, Helander et al. 1995, Amick et al. 1997, Garriott 2003). Η προσθήκη συντηρητικού έχει κριθεί αναγκαία για τη συντήρηση των δειγμάτων αν και η χρησιμότητά τους έχει αμφισβητηθεί για δείγματα που προέρχονταν από πτώματα σε σήψη (Chang et al. 1989, Helander et al. 1995).

Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου στις συγκεντρώσεις των πτητικών ουσιών σε αίμα εθελοντή αιμοδότη, απουσία ή παρουσία αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης, σε συνάρτηση με το χρόνο:

Προκειμένου να υποστηριχθεί η παρατήρηση ότι η αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών στα δείγματα που προέρχονταν από πτώματα οφείλονταν στο μικροβιακό φορτίο που έφεραν, και συγχρόνως να αποκλειστεί η επίδραση βιοχημικών παραγόντων (δράση ADH, ALDH) που υπήρχαν στο αίμα, επωάστηκαν δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη, απουσία ή παρουσία αιθανόλης ή/και ακεταλδεϋδης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 4°C, χωρίς την προσθήκη



συντηρητικού. Το αίμα του εθελοντή αιμοδότη ήταν, προφανώς, ελεύθερο μικροβίων και οι χειρισμοί των δειγμάτων έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως και για τα δείγματα που μελετήθηκαν από νεκροτομικό υλικό.

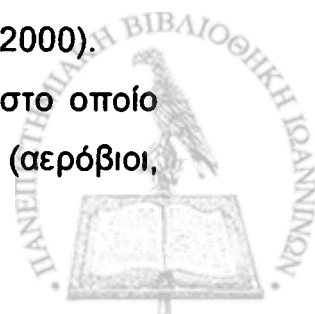
Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι τα επίπεδα της αιθανόλης μειώθηκαν με την πάροδο του χρόνου και η μείωση ήταν τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη ήταν η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα. Η παρατηρούμενη μείωση αποδόθηκε σε εξάτμιση της αιθανόλης, ενώ ανάλογη μεταβολή (σε μεγαλύτερο όμως ποσοστό) παρατηρήθηκε και για την ακεταλδεΰδη (πολύ πτητική ουσία). Τα επίπεδα της ακεταλδεΰδης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ήταν ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης σε αυτά. Δεν ανιχνεύτηκε 1-προπανόλη στα δείγματα, ούτε καταγράφηκε μεταβολή στις συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης και της ακετόνης.

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι στα δείγματα αίματος εθελοντή αιμοδότη δεν υπήρχαν οι «παράγοντες» που μπορούσαν να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που αφορούσαν στο αίμα που συλλέχθηκε από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι οι «παράγοντες» αυτοί, είναι οι παρόντες στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά μικροοργανισμοί, που έχουν δραστηριοποιηθεί κατά την εξέλιξη των σηπτικών εξεργασιών στα πτώματα πριν τη δειγματοληψία.

Επίδραση του υπερκείμενου αέρα στους περιέκτες αποθήκευσης βιολογικών υλικών, στη συγκέντρωση των πτητικών ουσιών:

Είναι γνωστό ότι, αμέσως μετά το θάνατο, μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών εισέρχεται από το έντερο στους παρακείμενους ιστούς και τα τριχοειδή, και από εκεί φέρεται μακρύτερα στους υπόλοιπους ιστούς. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί δεσμεύουν το οξυγόνο των ιστών, μολονότι δε ο αριθμός τους προοδευτικά ελαττώνεται, δημιουργούν εντούτοις τις κατάλληλες συνθήκες -με την ελάττωση και του διαθέσιμου οξυγόνου- για την ανάπτυξη των πλέον δραστικών αναερόβιων μικροοργανισμών (Κουτσελίνης 2000).

Το είδος των μικροοργανισμών που αποικούν ένα πτώμα στο οποίο βρίσκονται σε εξέλιξη σηπτικές εξεργασίες, μπορεί να διαφέρει (αερόβιοι,



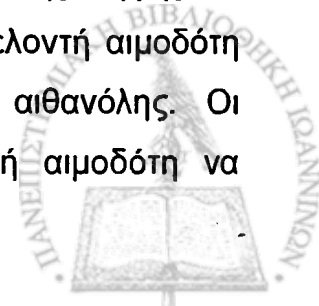
αναερόβιοι ή και μικτός πληθυσμός) ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η σήψη και το στάδιο αυτής. Κατά τη δειγματοληψία βιολογικών υλικών από πτώματα τα δείγματα φέρουν, προφανώς, το μικροβιακό φορτίο που υπήρχε στα πτώματα.

Δείγματα αίματος, που συλλέχθηκαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε περιέκτες αποθήκευσης που είχαν διαφορετική ποσότητα υπερκείμενου αέρα, και διαφορετική επιφάνεια επαφής του δείγματος με τον υπερκείμενο αέρα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι τα αρχικά επίπεδα της αιθανόλης μεταβλήθηκαν με διαφορετικό και μη προβλέψιμο τρόπο στα δείγματα που είχαν μεγάλη ποσότητα διαθέσιμου αέρα και μεγάλη επιφάνεια επαφής με τον αέρα. Αυτό αποδόθηκε στο διαφορετικό μικροβιακό φορτίο που έφεραν τα δείγματα. Στα δείγματα αυτά παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση των επιπέδων της 1-προπανόλης όταν παράλληλα συνέβαινε και αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης.

Οι παρατηρήσεις αυτές «ενίσχυσαν» το συμπέρασμα ότι η παραγωγή της 1-προπανόλης σε βιολογικά υλικά συμβαίνει παράλληλα με την μεταθανάτια παραγωγή της αιθανόλης σαν συνέπεια της μικροβιακής δραστηριότητας.

Πειραματική αναπαραγωγή και μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης:

Ο ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα που ελήφθηκε από δύο πτώματα (Περιστατικό 1 και 2) που βρίσκονταν σε εξέλιξη οι σηπτικές εξεργασίες, πραγματοποιήθηκε με στόχο την πειραματική αναπαραγωγή και την μελέτη της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης, που μπορεί να είχε συμβεί στο κάθε πτώμα από το οποίο ελήφθηκε το αίμα και με το οποίο πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός. Το αίμα του εθελοντή αιμοδότη αποτελούσε το υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών της σήψης που υπήρχαν στο αίμα του πτώματος. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο η ανάπτυξη των μικροβίων της σήψης θα επηρεαζόταν από την παρουσία αιθανόλης, το αίμα του εθελοντή αιμοδότη ιχνηθετήθηκε προηγούμενα με διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Οι επιλογές αυτές έγιναν προκειμένου το αίμα του εθελοντή αιμοδότη να



αποτελέσει «πρότυπο» δείγμα αίματος που θα μπορούσε να είχε συλλεχθεί από πτώμα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής.

Τα δύο δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των δύο αντίστοιχων περιστατικών είχαν χαρακτηριστεί «ύποπτα» για μικροβιακή δραστηριότητα και μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης αφού, και στα δύο, οι συγκεντρώσεις των πτητικών ουσιών που είχαν προσδιοριστεί κατά την πρώτη αέριο χρωματογραφική ανάλυση, μετά τη νεκροψία-νεκροτομή, ήταν υψηλές ($C_{1\text{προπ}}$ > 0,10 mg/dL, $C_{\text{ακεταλ}}$ > 0,50 mg/d και $C_{2\text{προπ}}$ > 0,10 mg/dL). Η συγκέντρωση της αιθανόλης, στο αίμα του Περιστατικού 1 ήταν μικρότερη του νομικού ορίου (< 50,0 mg/dL), ενώ στο αίμα του Περιστατικού 2 ήταν μεγαλύτερη του νομικού ορίου (> 50,0 mg/dL).

Μετά τη δειγματοληψία των δειγμάτων αίματος των Περιστατικών 1 και 2 πραγματοποιήθηκε επώασή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να διαπιστωθεί αν εξακολουθεί να υπάρχει σε αυτά η «δυναμική» της παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης, ουσιαστικά, για να διαπιστωθεί αν παρέμεναν «ενεργοί» οι μικροοργανισμοί της σήψης που μπορούσαν να παράγουν τις προαναφερόμενες πτητικές ουσίες.

Κατά την επώαση παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης και 1-προπανόλης στο αίμα και των δύο περιστατικών και αυτό θεωρήθηκε ικανή απόδειξη της παρουσίας και «ενεργότητας» των μικροοργανισμών σε αυτά. Η μικροβιολογική ανάλυσή τους κρίθηκε μη απαραίτητη αφού δεν ενδιέφερε το είδος ή ο αριθμός των μικροοργανισμών που περιείχαν.

Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος του εθελοντή αιμοδότη μετά τον ενοφθαλμισμό και την επώαση έδειξε ότι τα επίπεδα της αιθανόλης αυξήθηκαν σε όλα τα δείγματα και η αύξηση κυμαίνονταν γύρω από την «ένοχη» συγκέντρωση των 50,0 mg/dL. Παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της αιθανόλης έχει καταγραφεί σε προηγούμενες μελέτες σε δείγματα από πτώματα (Corry 1978, O'Neal 1996a, Garriott 2003). Συνεπώς, το πειραματικό «πρότυπο» μελέτης της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης που κατασκευάστηκε, προσέγγιζε ικανοποιητικά την μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης, όπως θα μπορούσε να είχε εξελιχθεί στο πτώμα.

Η παραγωγή 1-προπανόλης, κατά τη μελέτη του αίματος του Περιστατικού 1, ήταν παράλληλη με την παραγωγή αιθανόλης, και η αύξηση



στη συγκέντρωσή της ήταν τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα του αίματος εθελοντή αιμοδότη.

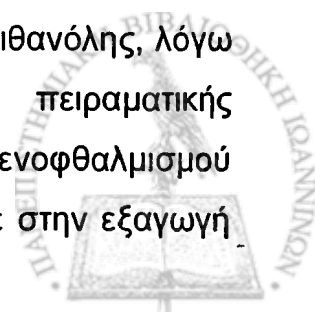
Η παραγωγή 1-προπανόλης, κατά τη μελέτη του αίματος του Περιστατικού 2, ήταν παράλληλη με την παραγωγή αιθανόλης, αλλά η αύξηση στη συγκέντρωσή της ήταν παρόμοια για όλες τις αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που ήταν διαφορετικές του μηδενός.

Οι παρατηρηθείσες διαφορές, κατά την μελέτη των δύο Περιστατικών δικαιολογούνται, από το γεγονός ότι κάθε πτώμα αποτελεί ένα μοναδικό βιοχημικό σύστημα και οι σηπτικές εξεργασίες που έχουν ήδη λάβει χώρα σε αυτό (πριν τη δειγματοληψία) είναι πιθανόν να έχουν δημιουργήσει διαφορετικό υπόβαθρο μικροβιακής παραγωγής πτητικών ουσιών.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει γενικά αποδεκτός τρόπος που να επιτρέπει την διάκριση της αιθανόλης που υπάρχει στον οργανισμό τη στιγμή του θανάτου, από την αιθανόλη που παράγεται στο πτώμα μεταθανάτια. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχει δημοσιευτεί μία μόνο μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε επίμυς, όπου προσδιορίστηκε ο λόγος της παραγόμενης ποσότητας αιθανόλης προς την παραγόμενη ποσότητα 1-προπανόλης. Ο λόγος αυτός ήταν μικρότερος από 20:1 για το αίμα και μικρότερος από 10:1 για τον σκελετικό μυ, και οι συγγραφείς υποστήριξαν πως παρόμοια συσχέτιση αναμενόταν να ισχύει και για τον άνθρωπο (Nanikawa et al. 1982). Η άποψη αυτή αμφισβητήθηκε έντονα στη συνέχεια, επειδή δεν αναφέρονταν το εύρος των τιμών του προσδιοριζόμενου λόγου (Canfield et al. 1993, O'Neal et al. 1996a, Johnson et al. 2004).

Σε άλλη εργασία αναφέρθηκαν τα εύρη της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στον εγκέφαλο ατόμων που κατέληξαν μετά από πνιγμό, και τα οποία κυμαίνονταν από 0,001 mg/g ως 0,076 mg/g (Moriya et al. 2004), χωρίς όμως να γίνεται συσχέτιση με τα επίπεδα είτε της παραγόμενης αιθανόλης είτε της αρχικής αιθανόλης στο δείγμα.

Όλα τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έχουν συγκλίνει στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης στο αίμα συμβαίνει παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης, λόγω μεταθανάτιας παραγωγής τους. Η διεξαγωγή της πειραματικής αναπαραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης, μέσω του ενοφθαλμισμού αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος, αποσκοπούσε στην εξαγωγή



ποσοτικής σχέσης που θα συνέδεε τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα, όπως και έγινε. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και 1-προπανόλης οδήγησαν στην εξαγωγή των παρακάτω σχέσεων, που επέτρεψαν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης (C_0) κατά την ημέρα 0 μετά την ιχνηθέτηση και τον ενοφθαλμισμό:

$$\alpha) C_0 = C_{αιθ} (1 - (C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) / f) \quad (1),$$

για το Περιστατικό 1

$$\beta) C_0 = C_{αιθ} * f / ((C_{1προπ} - C^0_{1προπ}) + f) \quad (2),$$

για το Περιστατικό 2.

Οι σχέσεις (1) και (2) εφαρμόστηκαν στη συνέχεια για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στο αίμα του ατόμου, του κάθε Περιστατικού (1 και 2) αντίστοιχα, κατά τη στιγμή του θανάτου. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ($C_{αιθ}$) και της 1-προπανόλης ($C_{1προπ}$) που προσδιορίστηκαν στο αίμα κατά την ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή. Η τιμή του συντελεστή f , που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε περιστατικό, προέκυψε από το αντίστοιχο πείραμα ενοφθαλμισμού.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης που υπολογίστηκε ότι υπήρχε τη στιγμή του θανάτου στο αίμα του ατόμου του Περιστατικού 1 ήταν πολύ μικρή (5,00 mg/dL). Με δεδομένο ότι το αίμα του Περιστατικού 1 είχε μικρή συγκέντρωση αιθανόλης, κατά την ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή, ήταν πολύ πιθανό κατά τη στιγμή του θανάτου η συγκέντρωση της αιθανόλης να ήταν πράγματι τόση.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου, που υπολογίστηκε ότι υπήρχε στο αίμα του ατόμου του Περιστατικού 2, ήταν μέτρια και μη «ένοχη» (26,7 mg/dL). Με δεδομένο ότι το αίμα του Περιστατικού 2 προερχόταν από πτώμα σε προχωρημένη σήψη, ήταν πολύ πιθανό κάποιο ποσοστό της μετρηθείσας αιθανόλης (112 mg/dL), κατά την ανάλυση μετά τη νεκροψία-νεκροτομή, να οφειλόταν σε μεταθανάτια παραγωγή. Η υψηλή συγκέντρωση της αιθανόλης που προσδιορίστηκε στο δείγμα κατά την ανάλυση δεν απέκλειε όμως και το ενδεχόμενο της κατάποσης αιθανόλης «εν ζωή». Συνεπώς, η υπολογισθείσα τιμή ήταν πιθανό να ανταποκρινόταν σε σημαντικό βαθμό στην πραγματική τιμή, χωρίς να μπορεί όμως να αρθεί πλήρως η αβεβαιότητα ως προς το αποτέλεσμα,



γεγονός που θα συνέβαινε μόνο αν ήταν γνωστή η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα του ατόμου τη στιγμή του θανάτου.

Η μέθοδος, της πειραματικής αναπαραγωγής και μελέτης της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης, που προτείνεται στην παρούσα εργασία, επιτρέπει τον υπολογισμό, ή τουλάχιστον την εκτίμηση, της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπάρχει στο αίμα την στιγμή του θανάτου. Εφαρμόζεται εξατομικευμένα για κάθε περιστατικό στο οποίο οι προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις των πτητικών στο αίμα το καθιστούν «ύποπτο» για μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης. Η διαδικασία είναι απλή και μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε εργαστήριο Δικαστικής Τοξικολογίας όπου πραγματοποιείται ανάλυση αιθανόλης με αέρια χρωματογραφία, σε αντιδιαστολή με άλλες πολύπλοκες μεθόδους που έχουν προταθεί για πιστοποίηση της κατάποσης αιθανόλης “εν ζωή” (Helander et al. 1995, Emrich et al. 1997, Wurst et al. 2000, Hansson et al. 2001, Refaai et al. 2002, Best et al. 2003), και χωρίς να απαιτείται η πραγματοποίηση μικροβιολογικών καλλιεργειών.

Η εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλο αριθμό περιστατικών θα δώσει τη δυνατότητα άρσης της όποιας αβεβαιότητας ως προς την τιμή της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπολογίζεται κατά τη στιγμή του θανάτου μετά την εφαρμογή της ποσοτικής σχέσης μεταξύ αιθανόλης και 1-προπανόλης που εξάγεται για το κάθε περιστατικό.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- 1) Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης παράλληλα με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ακεταλδεύδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων αίματος, που ελήφθησαν μεταθανάτια κατά τη διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής, από περιστατικά αιφνίδιων ή βίαιων θανάτων, που έδειξε ότι:
 - I. Το 84,1% των δειγμάτων αίματος είχε συγκέντρωση αιθανόλης < 50,0 mg/dL.
 - II. Από το 76,4% των δειγμάτων αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης < 10,0 mg/dL, ποσοστό δειγμάτων 98% για την ακεταλδεύδη, 98% για την 1-προπανόλη, 94% για την 2-προπανόλη και 93% για την ακετόνη, είχε παράλληλα πολύ μικρή ή μη ανιχνεύσιμη ποσότητα του κάθε πτητικού αντίστοιχα.
 - III. Στο 23,6% των δειγμάτων αίματος που είχε συγκέντρωση αιθανόλης > 10,0 mg/dL ανιχνεύτηκαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις των πτητικών ακεταλδεύδης, 1-προπανόλης, 2-προπανόλης και ακετόνης.
 - IV. Ο προσδιορισμός σε δείγματα αίματος συγκεντρώσεων ακεταλδεύδης > 0,50 mg/dL, 1-προπανόλης > 0,10 mg/dL και 2-προπανόλης > 0,10 mg/dL, τα καθιστά «ύποπτα» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης (συγκεντρώσεις πτητικών «ενδεικτικές» μικροβιακής δραστηριότητας).
 - V. Από τα δείγματα αίματος που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης από 10,0 mg/dL ως 300 mg/dL, ποσοστό 21% των δειγμάτων χαρακτηρίστηκαν «ύποπτα» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης.
- 2) Οι σηπτικές εξεργασίες μπορεί να έχουν εξελιχθεί σε διαφορετικό βαθμό στα διάφορα μεταθανάτια βιολογικά υλικά όπως υποδεικνύεται από τις συγκεντρώσεις των πτητικών ουσιών που προσδιορίστηκαν. Συνεπώς η δειγματοληψία και ανάλυση διαφορετικών βιολογικών υλικών από το ίδιο πτώμα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της



συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα, όπως έχει προταθεί στη βιβλιογραφία.

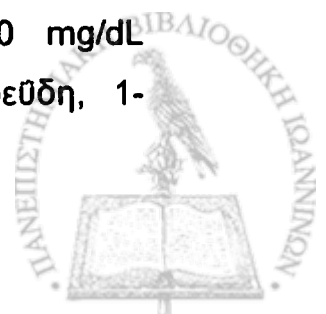
- 3) Στα δείγματα βιολογικών υλικών που καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων της 1-προπανόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, υπήρχε παράλληλη αύξηση στα επίπεδα της αιθανόλης, ενώ για τα υπόλοιπα πτητικά που προσδιορίστηκαν δεν υπήρχε συσχέτιση με τα επίπεδα της αιθανόλης.
- 4) Η ακεραιότητα των δειγμάτων βιολογικών υλικών, μετά τη δειγματοληψία κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, μπορεί να διασφαλιστεί κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C, απουσία συντηρητικού, μόνο για 20 ημέρες. Για τα βιολογικά υλικά που προέρχονται από πτώματα σε σήψη δεν είναι δυνατή η διασφάλιση της ακεραιότητάς τους.
- 5) Η μεταβολή των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών στο αίμα εξαρτόνταν από τη δράση των μικροοργανισμών της σήψης και από παράγοντες που επηρέαζαν την ανάπτυξή τους.
- 6) Η συσχέτιση της παραγόμενης αιθανόλης και 1-προπανόλης, που προσδιορίζονται σε δείγμα αίματος που λαμβάνεται μεταθανάτια, μπορεί να οδηγήσει στην εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου.
- 7) Ο ενοφθαλμισμός αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα, που είναι πιθανό να έχει μικροβιακό φορτίο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πειραματικό «πρότυπο» μελέτης της παραγωγής αιθανόλης και της 1-προπανόλης όπως είναι πιθανό να έχει εξελιχθεί στο συγκεκριμένο πτώμα.



6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αιθανόλη είναι μια πτητική χημική ένωση, μέλος της ομόλογης σειράς των αλκοολών. Εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών. Είναι όμως δυνατόν, να παραχθεί μεταθανάτια από τη δράση των μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη (αλκοολική ζύμωση). Επίσης είναι δυνατόν να παραχθεί στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία. Ως αποτέλεσμα η μετρούμενη μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης μπορεί να διαφέρει από την πραγματική συγκέντρωση που υπήρχε στον οργανισμό κατά τη στιγμή του θανάτου. Η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των παραγόντων που επηρεάζουν τη μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης, ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης –κατάποση “εν ζωή” ή μεταθανάτια παραγωγή- και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου, αποτελούν προβλήματα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετράται εργαστηριακά στα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα κλπ) χρησιμοποιείται σαν αποδεικτικό στοιχείο σε ποινικά και αστικά δικαστήρια.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε καταγραφή των πτητικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε διάφορα βιολογικά υλικά που ελήφθησαν από πτώματα κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, από περιστατικά αιφνίδιων ή βίαιων θανάτων. Πραγματοποιήθηκε, για πρώτη φορά, προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης παράλληλα με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ακεταλδεϋδης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης σε 195 δείγματα αίματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 84,1% των δειγμάτων αίματος είχε συγκέντρωση αιθανόλης < 50,0 mg/dL. Από το 76,4% των δειγμάτων αίματος που είχε συγκέντρωση αιθανόλης < 10,0 mg/dL, είχε παράλληλα πολύ μικρή ή μη ανιχνεύσιμη ποσότητα ακεταλδεϋδης ποσοστό 98%, 1-προπανόλης ποσοστό 98%, 2-προπανόλης ποσοστό 94% και ακετόνης ποσοστό 93%. Στο 23,6% των δειγμάτων αίματος που είχε συγκέντρωση αιθανόλης > 10,0 mg/dL ανιχνεύτηκαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις των πτητικών ακεταλδεϋδης, 1-προπανόλης, 2-προπανόλης και ακετόνης.



Η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα των άλλων πτητικών ουσιών στο αίμα πραγματοποιήθηκε επίσης για πρώτη φορά, και έδειξε ότι δείγματα αίματος με συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης $> 0,50$ mg/dL, 1-προπανόλης $> 0,10$ mg/dL και 2-προπανόλης $> 0,10$ mg/dL, καθίστανται «ύποπτα» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης (συγκεντρώσεις πτητικών «ενδεικτικές» μικροβιακής δραστηριότητας). Δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν και είχαν συγκέντρωση αιθανόλης από 10,0 mg/dL ως 300 mg/dL, σε ποσοστό 21% χαρακτηρίστηκαν «ύποπτα» για μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης.

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της 1-προπανόλης και της 2-προπανόλης παράλληλα με την αιθανόλη κατά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων αίματος προσέφερε το πλεονέκτημα ότι με την ίδια, ουσιαστικά, απλή ανάλυση των δειγμάτων προσδιορίστηκε τόσο η συγκέντρωση της αιθανόλης, όσο και των άλλων πτητικών, και παράλληλα προέκυψαν τα στοιχεία που μπορούσαν να υποστηρίξουν την πιθανότητα μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης στο δείγμα.

Η δειγματοληψία και ανάλυση διαφορετικών βιολογικών υλικών από το ίδιο πτώμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης κρίθηκε μη απαραίτητη διαδικασία.

Ελέγχθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, του χρόνου αποθήκευσης, της διαθεσιμότητας του υπερκείμενου αέρα και της επιφάνειας επαφής με τον υπερκείμενο αέρα στους περιέκτες αποθήκευσης των βιολογικών υλικών, στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών. Βρέθηκε ότι η ακεραιότητα των δειγμάτων βιολογικών υλικών, μετά τη δειγματοληψία κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, μπορεί να διασφαλιστεί κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C , απουσία συντηρητικού, μόνο για 20 ημέρες, ενώ για τα βιολογικά υλικά που προέρχονταν από περιστατικά με προηγμένες σηπτικές αλλοιώσεις, δεν είναι δυνατή η διασφάλιση της ακεραιότητάς τους. Στα δείγματα βιολογικών υλικών που καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων της 1-προπανόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, υπήρχε παράλληλη αύξηση στα επίπεδα της αιθανόλης, ενώ για τα υπόλοιπα πτητικά που προσδιορίστηκαν δεν υπάρχει συσχέτιση με τα επίπεδα της αιθανόλης. Η ποσότητα του υπερκείμενου αέρα και η επιφάνεια επαφής του με τα βιολογικά υλικά των

περιεκτών αποθήκευσης επηρέαζε με διαφορετικό και μη προβλέψιμο τρόπο τα αρχικά επίπεδα αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών. Τέλος, βρέθηκε ότι η μεταβολή των επιπέδων της αιθανόλης και των άλλων πτητικών στο αίμα εξαρτόνταν από τη δράση των μικροοργανισμών της σήψης και από παράγοντες που επηρέαζαν την ανάπτυξή τους.

Αναπτύχθηκε πειραματικό «πρότυπο» μελέτης της παραγωγής αιθανόλης και 1-προπανόλης όπως ήταν πιθανό να έχει εξελιχθεί στο κάθε πτώμα. Η κατασκευή του «προτύπου» μελέτης συνίσταται στον ενοφθαλισμό αίματος εθελοντή αιμοδότη με αίμα πτώματος και την επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το «πρότυπο» αυτό εφαρμόστηκε σε αίμα πτώματος από δύο περιστατικά για τα οποία υπήρχαν οι «ενδείξεις» της μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής της αιθανόλης. Εξήχθη ποσοτική σχέση μεταξύ των επιπέδων της παραγόμενης αιθανόλης και 1-προπανόλης στο αίμα, που επέτρεψε την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα τη στιγμή του θανάτου.

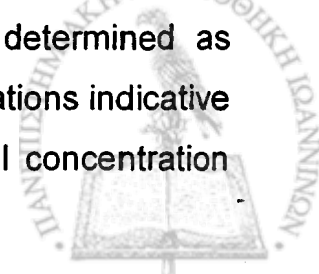


SUMMARY

Ethanol is a volatile compound that belongs to the homologous series of alcohols. It can be detected in the human body after the consumption of alcoholic beverages. It is possible though, to be produced postmortem by microbial activity (alcoholic fermentation) either in corpses or in specimens after sample collection. As a result the measured ethanol concentration differs from the actual ethanol concentration at the time of death. It is of fundamental gravity in Forensic Toxicology the clarification of the mechanism with which certain factors could complicate the interpretation of postmortem ethanol concentration, the determination of its unequivocal aetiology – exogenous or endogenous- and the estimation of the blood ethanol concentration at the time of death, as ethanol concentration determined in biological specimens (blood, urine etc) is regularly used in criminal and civil litigation.

In the present study has been determined the presence of volatile compounds detected in postmortem specimens collected from cases of sudden or violent deaths. Measurements, have been performed, for the first time, of the concentrations of acetaldehyde, 1-propanol, 2-propanol and acetone along with ethanol in 195 postmortem blood samples. The results showed that 84,1% of the blood specimens had blood ethanol concentrations < 50,0 mg/dL. Out of 76,4% of the blood specimens that had ethanol concentration < 10,0 mg/dL, had either very low or not detectable amounts of acetaldehyde 98%, 1-propanol 98%, 2-propanol 94% and acetone 93%. 23,6% of the blood specimens that had ethanol concentration > 10,0 mg/dL all had measurable amounts of acetaldehyde, 1-propanol, 2-propanol and acetone.

The correlation of ethanol concentrations with concentrations of other volatiles, has been also performed for the first time. Blood samples with acetaldehyde concentration > 0,50 mg/dL, 1-propanol concentration > 0,10 mg/dL and 2-propanol concentration > 0,10 mg/dL, were determined as “suspicious” for microbial ethanol production (volatile concentrations indicative of microbial activity). 21% of the blood samples with ethanol concentration



between 10,0-300 mg/dL, were determined as "suspicious" for postmortem ethanol production.

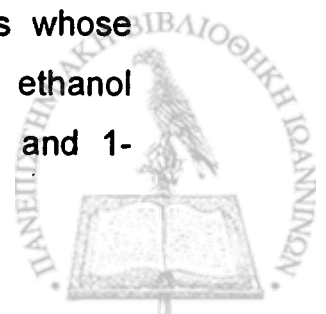
The determination of the acetaldehyde, 1-propanol and 2-propanol concentration along with ethanol concentration with the gas chromatographic procedure had the advantage that with one simple analysis of the postmortem specimen both the concentrations of ethanol and that of other volatiles could be determined and valuable information can be provided regarding the possibility of postmortem ethanol formation.

The collection and the analysis of different specimens from the same corpse for the determination of ethanol concentration was regarded as an unnecessary procedure.

The influence of the temperature, the time of storage, the availability of air and the contact surface with air in storage contents of biological specimens was studied on the concentrations of ethanol and other volatiles. This study has shown that following sample collection, the stability of the biological specimens can be provided only for 20 days during storage at 4°C, without preservative, while for the biological specimens from decomposed bodies these storage conditions are not adequate.

In the biological specimens were there was an increase of the levels of 1-propanol an increase of the levels of ethanol was simultaneously observed. The amount of air and its contact surface with the biological specimens in the storage contents affected the initial ethanol levels and those of other volatiles in a wide and unpredictable way. In conclusion, it was found that the increase and decrease of the ethanol levels and those of other volatiles in blood was a function of the activity of the putrefaction microorganisms and the factors that can affect their growth.

An experimental "model" was developed for the study of the production of ethanol and 1-propanol as it might have taken place in the corpses. The development of the experimental "model" was conducted by incubating, in room temperature, normal human blood that was inoculated with postmortem blood. This "module" was applied to two cases whose postmortem blood was "indicative" of postmortem microbial ethanol production. A quantitative relation between the levels of ethanol and 1-



7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amick G.D., Habben K.H. 1997. Inhibition of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in human blood by sodium fluoride. *J. Forensic Sci.* 42: 690-692.

Asai H., Imaoka S., Kuroki T., et al. 1996. Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome p450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 1004-1009.

Backer, R.C., R.V. Pisano, and I.M. Sopher. 1980. The comparison of alcohol concentrations in postmortem fluids and tissues. *J. Forensic Sci.* 23: 327-331.

Bavis, D.F. 1940. 145 drunken drivers: A blood alcohol study. *J. Lab. Clin. Med.* 25: 223-273.

Best C.A., Laposata M. 2003. Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Front. Biosci.* 8: e202-217.

Bogusz M., Guminska M., Markiewicz J. 1970. Studies on the formation of endogenous ethanol in blood putrefying in vitro. *J. Forensic Med.* 17: 156-168.

Bogusz M., Guminska M., Markiewicz J. 1972. Studies on the formation of ethanol and of pyruvate as its precursor from some di- and tricarboxylic compounds in putrefying blood in vitro. *Forensic Sci.* 1: 229-237.

Bogusz M., Poch J., Stasko W. 1977. Comparative studies on the rate of ethanol elimination in acute poisoning and in controlled conditions. *J. Forensic Sci.* 22: 446-451.

Bonnichsen R.K., Theorell H. 1951. An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 3: 58-62.



- Bradford B.U., Seed C.B., Handler J.A., et al. 1993. Evidence that catalase is a major pathway of ethanol oxidation in vivo: dose-response studies in deer mice using methanol as a selective substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 303:172-176.
- Briglia E.J., Bidanset J.H., Dal Cortivo L.A. 1992. The distribution of ethanol in postmortem blood specimens. *J. Forensic Sci.* 37: 991-998.
- Brown G.A., Neyland D., Reynolds W.J., et al. 1973. The stability of ethanol in stored blood: Part I. Important variables and interpretation of results. *Anal. Chim. Acta* 66: 271-283.
- Bucher T., Redetzki H. 1951. Eine spezifische photometrische bestimmung von athylalkohol auf fermentation wege. *Klinische Wochenschrift* 29: 615-616.
- Budd, R. 1982. ethanol levels in postmortem body fluids. *J. Cromatogr.* 252: 315-318.
- Caballeria J. 2003. Current concepts in alcohol metabolism. *Ann. Hepatolog.* 2: 60-68.
- Canfield D.V., Kupiec T., Huffine E. 1993. Postmortem alcohol production in fatal aircraft accidents. *J. Forensic Sci.* 38: 914-917.
- Caplan Y.H., Levine B. 1990. Vitreous humor in the evaluation of postmortem blood ethanol concentrations. *J. Anal. Toxicol.* 14: 305-307.
- Caro A.A., Cederbaum A.I. 2004. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. 44: 27-42.
- Canett J.W. 1938. The determination of ethanol in blood and other body fluids. *J. Lab. Clin. Med.* 23: 543-546.
- Chang J., Kollman S.E. 1989. The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood. *J. Forensic Sci.* 34: 105-109.



Chang R.B., Smith W.A., Walkin E., et al. 1984. The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. *J. Anal. Toxicol.* 8: 66-67.

Chao, T.C., and D.S. Lo. 1993. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 14: 303-308.

Chikasue F., Yashiki M., Miyazaki T., et al. 1988. Abnormally high alcohol concentration in the heart blood. *Forensic Sci. Int.* 39: 189-195.

Christopoulos, G., E.R. Kirch, and J.E. Gearrien. 1973. Determination of ethanol in fresh and putrefied postmortem tissues. *J. Chromatogr.* 87: 455-472.

Coe, J.I., and R.E. Sherman. 1970. Comparative study of postmortem vitreous humor and blood alcohol. *J. Forensic Sci.* 15: 185-190.

Cohle, S.D. 1994. A discussion of "Postmortem alcohol production in fatal aircraft accidents" (*J.F.S.* 1993, 38: 914-917). *J. Forensic Sci.* 39: 600-601.

Coldwell, B.B., and H.W. Smith. 1959. Alcohol levels in body fluids after ingestion of distilled spirits. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 43-52.

Cornell N.W., Crow K.E., Leadbetter M.G., et al. 1979. Rate-determining factors for ethanol oxidation in vivo and in isolated hepatocytes. In *Alcohol and Nutrition, Proceedings of a Workshop sponsored by NIAAA*, ed. Li T-K., Schenker S., Lumeng L. Washington DC: US Govt. Printing Office.

Corry J.E.L. 1978. Possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 1-56.

Crabb, D.W., M. Matsumoto, D.Chang and M. You. 2004. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol related pathology. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 49-63.



Curry A.S., Walker G.W., Simpson G.S. 1966. Determination of alcohol in blood by gas chromatography. *Analyst* 91: 742-743.

Davis G.L., Leffert R.L., Capt. Rantanen N.W. 1972. Putrefactive ethanol sources in postmortem tissues of conventional and germ-free mice. *Arch. Path.* 94: 71-74.

Edenberg H.J., Bosron W.F. 1997. Alcohol dehydrogenases. In: *Biotransformation* Guengerich F.P., editor. New York: Pergamon: 119-131.

Ellenbrook, L.D., and C.B. Van Gaasbeek. 1943. The reliability of chemical tests for alcoholic intoxications. *JAMA* 122: 996-1002.

Emrich J., Sprung R., Sammler J., et al. 1997. Identification of fatty acid methyl esters (FAMES) in postmortem tissue. A new marker of alcohol abuse? *Forensic Sci. Int.* 85: 41-49.

Felby S., Pharm B., Olsen J. 1969. Comparative studies of postmortem ethyl alcohol in vitreous humour, blood and muscle. *J. Forensic Sci.* 14: 93-101.

Garriott J.C. 2003. *Medical-Legal Aspects of Alcohol*. Tuscon, AZ: Lawyers & Judges, Publishing.

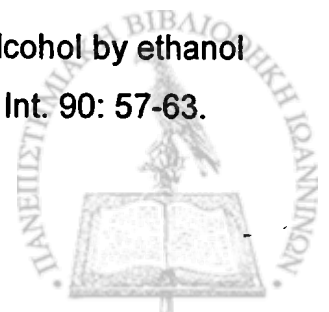
Gettler, A.O., and A.W. Freireich. 1931. Determination of alcohol intoxication during life by spinal fluid analysis. *J. Biol. Chem.* 92: 199-209.

Gilliland M.G., Bost R.O. 1993. Alcohol in decomposed bodies: postmortem synthesis and distribution. *J. Forensic. Sci.* 38: 1266-1274.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial fermentations. In *Bacterial Metabolism*, ed/ G. Gottschalk, 208-280, New York, Springer-Verlag inc.

Gouille J.P., Deveaux M. 2003. Judicial expertise in blood alcohol determination and toxicological analysis. *Ann. Biol. Clin.* 61: 269-274.

Grellner W., Iffland R. 1997. Assessment of postmortem blood alcohol by ethanol levels measured in fluids from putrefactive blisters. *Forensic Sci. Int.* 90: 57-63.



Hadley J.A., Smith G.S. 2003. Evidence for an early onset of endogenous alcohol production in bodies recovered from the water: implications for studying alcohol and drowning. *Acc. Anal. Prevent.* 35: 763-769.

Haffner H.T., Besserer K., Graw M., et al. 1997a. Methanol elimination in non-alcoholics: inter- and intraindividual variation. *Forensic Sci. Int.* 86: 69-76.

Haffner H.Th., Banger M., Graw M., et al. 1997b. The kinetics of methanol elimination in alcoholics and the influence of Ethanol. *Forensic Sci. Int.* 89: 129-136.

Haffner H.Th., Graw M., Besserer K., et al. 1996. Endogenous methanol: variation in concentration and rate of production. Evidence of a deep compartment? *Forensic Sci. Int.* 79: 145-154.

Hammond K.B., Rumack B.H., Rodgerson D.O. 1973. Blood ethanol: A report of unusually high levels in a living patient. *JAMA* 226: 63-64.

Hansen A.C. 1994. Validity of postmortem alcohol determination. *Ugeskr. Laeger* 156: 55-57.

Hansson P., Varga A., Krantz P., et al. 2001. Phosphatidyl-ethanol in post-mortem blood as a marker of previous heavy drinking. *Int. J. Legal Med.* 115: 158-161.

Harger R.N., Hulpieu H.R., Lamb E.B. 1937. The speed with which various parts of the body reach equilibrium in the storage of ethyl alcohol. *J. Biol. Chem.* 120: 684-704.

Harper D.R. 1989. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci. Int.* 43: 37-44.

Heise, H.A. 1967. Concentrations of alcohol in samples of blood and urine taken at the same time. *J. Forensic Sci.* 12: 454-462.



Helander A., Beck O., Jones A.W. 1995. Distinguishing ingested ethanol from microbial formation by analysis of urinary 5-Hydroxytryptophol and 5-Hydroxyindoleacetic acid. *J. Forensic Sci.* 40: 95-98.

Herold, K., and O. Prokop. 1960. Postmortem alcohol distribution differences in brain. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* 50:1.

Hine, C.H. 1951. Blood/brain distribution in 100 postmortem cases. *Proc. Am. Acad. Forensic Sci.* 1: 161.

Holford N.H.G. 1987. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin. Pharmacokinet.* 13: 273-292.

Isokoski, M., A. Alha, and K. Laiho. 1968. Bone marrow alcohol content in cadavers. *J. Forensic Med.* 15: 9-11.

Jenkins, A.J., B.S. Levine, and J.E. Smialek. 1995. Distribution of ethanol in postmortem liver. *J Forensic Sci* 40: 611-613.

Jetter, W.W. 1938. Studies in alcohol: I. The diagnosis of acute alcoholic intoxication by a correlation of clinical and chemical findings. *Am. J. Med. Sci.* 196: 475-487.

Johnson R.D., Lewis R.J., Canfield D.V., et al. 2004. Accurate assignment of ethanol origin in postmortem urine: liquid chromatographic-mass spectrometric determination of serotonin metabolites. *J. Chromatogr. B* 805: 223-234.

Jones, A.W. 2000. Alcohol-postmortem. In: *Encyclopaedia of forensic sciences*, ed. J. Siegel, G. Knupfer, P. Saukko, 112-126, London: Academic Press.

Jones AW. 2000. Fifty years on looking back at developments in methods of blood- and breath-alcohol analysis. ICADTS Conference paper.

Jones A.W. 2000. Aspects of in-vivo pharmacokinetics of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24: 400-402.



Jones A.W., Andersson L. 1995. Biotransformation of acetone to isopropanol observed in a motorist involved in a sobriety check. *J. Forensic Sci.* 40: 686-687.

Jones, A.W., and P. Holmgren. 2001. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J. Clin. Pathol.* 54: 699-702.

Jones, A.W., and P. Holmgren. 2003. Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *Forensic Sci. Int.* 135: 206-212.

Jones, A.W., K.A. Jönsson, and L. Jorfeldt. 1989. Differences between capillary and venous blood-alcohol concentrations as a function of time after drinking with emphasis on sampling variations in left vs right arm. *Clin. Chem.* 35: 400-404.

Jones A.W., Schuberth J. 1989. Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis: Importance of on-line process control. *J. Forensic Sci.* 34: 1116-1127.

Kaji H., Asanumo Y., Shibue H., et al. 1984. Intragastrointestinal alcohol fermentation syndrome: Report of two cases and review of the literature. *J. Forensic Sci. Soc.* 24: 461-471.

Kalapos M.P. 2003. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *B.B.A.* 1621: 122-139.

Kaye, S., and E. Cardona. 1969. Errors of converting a urine alcohol value into a blood alcohol level. *Am. J. Clin. Pathol.* 52: 577-581.

Knight B, Saukko P. 2004. Forensic aspects of alcohol. In: *Knights' Forensic Pathology*, Arnold Editions.

Krauland, W., E. Klug, and P. Toffel. 1979. Zur bestimmung der alkoholkonzentrationen in leichenorganen. *Blutalkohol* 16: 290-299.



Κουτσελίνης Σ.Α. 2000. Ιατροδικαστική. Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος, Αθήνα.

Kuhlman J.J., Levine B., Smith M.L., et al. 1991. Toxicological findings in federal aviation administration general aviation accidents. *J. Forensic Sci.* 36: 1121-1128.

Kupfer, D.M., A.K. Chaturvedi, D.V. Canfield, and B.A. Roe. 1999. PCR-based identification of postmortem microbial contaminants-A preliminary study. *J. Forensic Sci.* 44: 592-596.

Lands W.E.M. 1998. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 15: 147-160.

Levine, B., and J.E. Smialek. 2000. Status of alcohol absorption in drinking drivers killed in traffic accidents. *J. Forensic Sci.* 45:3-6.

Lewis R.J., Johnson R.D., Angier M.K., et al. 2004. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Sci. Int.* 146: 17-24.

Li T-K., Vallee B.L. 1969. Alcohol dehydrogenase and ethanol metabolism. *Surg. Clin. North Am.* 49: 577-582.

Lieber C., De Carli L. 1970. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245

Lieber C.S. 1999. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998). A review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23: 991-1007.

Logan B.K, Gullberg R.G., Elenbaas J.K. 1994. Isopropanol interference with breath alcohol analysis: A case report. *J. Forensic Sci.* 39: 1107-1111.

Logan B.K., Jones A.W. 2000. Endogenous ethanol 'Auto-Brewery Syndrome' as a drunk-driving defense challenge. *Med. Sci. Law* 40: 206-214.



Machata G. 1975. The advantages of automated blood alcohol determination by headspace analysis. *Z Rechtsmed.* 75: 229-234.

Marshall A.W., Kingstone D., Boss M., et al. 1983. Ethanol administration in males and females: relationship to menstrual cycle and body composition. *Hepatology* 3: 701-706.

Martin, E., W. Moll, P. Schmid, and L. Dettli. 1984. The pharmacokinetics of alcohol in human breath, venous and arterial blood after oral ingestion. *Eur. J. Pharmacol.* 26: 619-626.

Mayes R., Levine B., Smith M.L., et al. 1992. Toxicologic findings in the USS Iowa disaster. *J. Forensic Sci.* 37: 1352-1357.

Mezey E., Imbembo A.L., Potter J.J., et al. 1975. Endogenous Ethanol production and hepatic disease following jejunoileal bypass for morbid obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 1277-1283.

Μιχαλόδημητράκης Μ. 1997. Ιατροδικαστική διερεύνηση του θανάτου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα: 323-328.

Moriya F., Ishizu H. 1994. Can microorganisms produce alcohol in body cavities of a living person?: A case report. *J. Forensic Sci.* 39: 883-888.

Moriya F., Hashimoto Y. 2004. Postmortem production of ethanol and n-propanol in the brain of drowned persons. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 25:131-133.

Morrison R.T., Boyd R.N. 1983. Organic chemistry. Fourth Edition, Allyn and Bacon Inc, Massachusetts:455-463.

Mullen P.W. 1977. The metabolism and pharmacokinetics of alcohol in man. *J. Forensic Sci. Soc* (17): 49-55.



- Nanikawa R., Ameno K., Hashimoto Y., et al. 1982. Medicolegal studies on alcohol detected in dead bodies-alcohol levels in skeletal muscle. *Forensic Sci. Int.* 20: 133-140.
- Nanikawa R., Kotoku S. 1974. Medicolegal observations on a dead body. Drawn up from the sea bed, with special reference to ethanol and diatoms. *Forensic Sci.* 3: 225-232.
- Nanikawa R., Moriya F., Hashimoto Y. 1988. Experimental studies on the mechanism of ethanol formation in corpses. *Z. Rechtsmed.* 101: 21-26.
- Nicloux M. 1936. Neof ormation d' alcool ethylique dans le cadavre humain en voie de putrefaction. *Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie, Paris* 121: 975-978.
- Norberg A., Jones A.W., Hahn R.G., et al. 2003. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin. Pharmacokinet.* 42: 1-31.
- Ohnishi K., Lieber C.S. 1977. Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system. Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* 20: 7124-7131.
- O'Neal C.L., Poklis A. 1996a. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 17: 8-20.
- O'Neal C.L., Wolf C.E., Levine B., et al. 1996b. Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Sci. Int.* 83: 31-38.
- Ohshima, T., T. Kondo, Y. Sato, and T. Takayasu. 1997. Postmortem alcohol analysis of the synovial fluid and its availability in medico-legal practices. *Forensic Sci. Int.* 90: 131-138.



Pélissier-Alicot, A.L., M. Fornaris, C. Bartoli, M.D. Piercecchi-Marti, A. Sanvoisin, and G. Leonetti. 2004. An unusual case of post-mortem redistribution of ethanol. *Forensic Sci. Int.* article in press.

Plueckhahn, V.D. 1967. The significance of blood alcohol levels at autopsy. *Med. J. Aust.* 2: 118-124.

Plueckhahn, V.D., and B. Ballard. 1968. Factors influencing the significance of alcohol concentrations in autopsy blood samples. *Med. J. Aust.* 1: 939-943.

Plueckhahn, V.D., M.C. Path and B. Ballard. 1967. Diffusion of stomach alcohol and heart alcohol concentration at autopsy. *J. Forensic Sci.* 12: 463-470.

Pounder, D.J. and K. Yonemitsu. 1991. Postmortem absorption of drugs and ethanol from aspirated vomitus – an experimental model. *Forensic Sci. Int.* 51: 189-195.

Pounder D.J., Stevenson R.J., Taylor K.K. 1998. Alcoholic ketoacidosis at autopsy. *J. Forensic Sci.* 43: 812-816.

Ramchandani V.A., Bosron W.F., Li T.K. 2001. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol. Biol.* 49:676-682.

Refaai M.A., Nguyen P.N., Steffensen T.S., et al. 2002. Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake. *Clin. Chem.* 48: 77-83.

Saady, J.J., A. Poklis, and H.P. Dalton. 1993. Production of urinary ethanol after sample collection. *J. Forensic Sci.* 38: 1467-1471.

Salaspuro M. 1997. Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Add. Biol.* 2: 35-46.



Scott, W., I. Root, and B. Sanborn. 1974. The use of vitreous humor for determination of ethyl alcohol in previously embalmed bodies. *J. Forensic Sci.* 19: 913-916.

Shepherd, M.F., K.D. Lake, and M.A. Kamps. 1992. Postmortem changes and pharmacokinetics: review of the literature and case report. *Ann. Pharmacother.* 26: 510-514.

Skopp G. 2004. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142: 75-100.

Smalldon K.W., Brown G.A. 1973. The stability of ethanol in stored blood. Part II. The mechanism of ethanol oxidation. *Anal. Chim. Acta.* 66: 285-290.

Smialek J.E., Levine B. 1998. Diabetes and decomposition: A case of diabetic ketoacidosis with advanced postmortem change. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 19: 98-101.

Smith M.D., Olson C.L. 1975. Differential amperometric determination of alcohol in blood or urine alcohol dehydrogenase. *Anal. Chem.* 47: 1074-1077.

Smith J.V., Wulff D, Early R.J. 1989. The analysis of blood alcohol using the HP 19395A headspace sampler and fused silica capillary columns. *Hewlett Packard Gas Chromatography*: 1-7.

Stone, R.E., and P.A. Rooney. 1984. A study using body fluids to determine blood alcohol. *J. Anal. Toxicol.* 8: 95-96.

Sturner W.Q., Herrmann M.A., Boden C., et al. 2000. The Frye hearing in Florida: An attempt to exclude scientific evidence. *J. Forensic Sci.* 45: 908-910.

Sulkowski H.A., Wu A.H.B., McCarter Y.S. 1995. In-vitro production of ethanol in urine by fermentation. *J. Forensic Sci.* 40: 990-993.



Sylvester, P.A., N.A.C.S. Wong, B.F. Warren, and D.L. Ranson. 1998. Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *J. Clin. Pathol.* 51: 250-252.

Tagliaro F., G. Lubli, S. Ghielmi, D. Franchi and M. Marigo. 1992. Chromatographic methods for blood alcohol determination. *J.Chromatogr.* 580: 161-190.

Takayasu T., Ohshima T., Tanaka N., et al. 1995a. Postmortem degradation of administered ethanol-d6 and production of endogenous ethanol: experimental studies using rats and rabbits. *Forensic Sci. Int.* 76: 129-140.

Takayasu T., Ohshima T., Tanaka N., et al. 1995b. Experimental studies on postmortem diffusion of ethanol-d6 using rats. *Forensic Sci. Int.* 76: 179-188.

Tangerman A. 1997. Highly sensitive gas chromatographic analysis of ethanol in whole blood, serum, urine, and fecal supernatants by the direct injection method. *Clin. Chem.* 43: 1003-1009.

Teresinski G., Buszewicz G., Madro R. 2002. The influence on the level of Ketone bodies in hypothermia. *Forensic Sci. Int.* 127: 88-96.

Teresinski G., Buszewicz G., Madro R. 2005. Biochemical background of ethanol-induced cold susceptibility. *Legal. Med.* 7: 15-23.

Tsokos, M., and K. Püschel. 2001. Postmortem bacteriology in forensic pathology: diagnostic value and interpretation. *Legal Med.* 3: 15-22.

Ueno Y., Adachi J., Imamichi H., et al. 1996. Effect of cytochrome P4502E1 genotype on ethanol elimination rate in alcoholics and control subjects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20: 17A-21A.

Van Eys J., Kaplan N.O. 1957. Yeast alcohol dehydrogenase III. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 2782-2786.



Videira de Lima I., Midio A.F. 1999. Origin of blood ethanol in decomposed bodies. *Forensic Sci. Int.* 106: 157-162.

VonWartburg J-P., Belhune J.L., Vallee B.L. 1964. Human liver alcohol dehydrogenase. Kinetic and pharmacological properties. *Biochemistry* 3: 1775-1782.

Vu, N.T., A.K. Chaturvedi, D.V. Canfield, J.W. Soper, D.M. Kupfer, and B.A. Roe. 2000. DNA-based detection of ethanol-producing microorganisms in postmortem blood and tissues by polymerase chain reaction. Final Report: Federal Aviation Administration.

Wagner K. 1936. Über die veränderlichkeit des alcoholgehaltes von leichenblut und nicht steril aufbewahrten blutproben. *Deuts. Z. Ges. Gerich. Med.* 26: 276-292.

Wilkinson P.K., Sedman A.J., Sakmar E., et al. 1977. Pharmacokinetics of ethanol after oral administration in the fasting state. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5: 207-224.

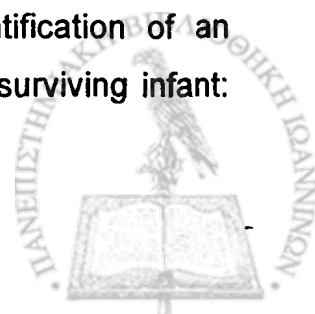
Winek, C.L. Jr., C.L. Winek, and W.W. Wahba. 1995. The role of trauma in postmortem blood alcohol determination. *Forensic Sci. Int.* 71: 1-8.

Winek, C.L., and F.M. Esposito. 1981. Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Sci. Int.* 17: 27-36.

Winek, C.L., and T. Jones. 1980. Blood versus bone marrow ethanol concentrations in rabbits and humans. *Forensic Sci. Int.* 16: 101-109.

Winek, C.L., J. Bauer, W.W. Wahba and W.D. Collom. 1993. Blood versus synovial fluid ethanol concentrations in humans. *J. Anal. Toxicol.* 17: 233-235.

Wu A.H.B., Kelly T., McKay C., et al. 1995. Definitive identification of an exceptional high methanol concentration in an intoxication of a surviving infant:



Methanol metabolism by first-order elimination kinetics. *J. Forensic Sci.* 40: 315-320.

Wurst F.M., Kempter C., Metzger J., et al. 2000. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* 20: 111-116.

Zuba D., Piekoszewski W., Pach J., et al. 2002. Concentration of ethanol and other volatile compounds in the blood of acutely poisoned alcoholics. *Alcohol* 26: 17-22.

Zuba D., Chlobowska Z., Parczewski A. 1998. Analysis of volatile organic compounds in blood of people consuming alcoholic drinks by means of gas chromatography. *Probl. Forensic Sci.* 38: 36-54.

Zumwalt R.E., Bost R.O., Sunshine I. 1982. Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies. *J. Forensic Sci.* 27: 549-554.

