



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**Sudskomedicinski aspekti
promene koncentracije etanola u
biološkim uzorcima čuvanim u
kontrolisanim laboratorijskim
uslovima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Goran Stojiljković

Kandidat:
dr Miljen Maletin

Novi Sad, 2016. godine

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Goranu Stojiljkoviću na ukazanom poverenju, strpljenju, stručnoj pomoći i nesebičnom odnosu punom razumevanja i podrške.

Zahvaljujem se svim članovima Komisije na korisnim savetima, čime su nesumnjivo doprineli kvalitetu ove disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama kolektiva Centra za sudsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine.

Naposletku, ali ne i najmanje važno, zahvaljujem se svojoj porodici, bez čijeg razumevanja ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana.

Autor

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Miljen Maletin
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Goran Stojiljković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Sudskomedicinski aspekti promene koncentracije etanola u biološkim uzorcima čuvanim u kontrolisanim laboratorijskim uslovima
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8/ stranica 126/ slika 8/ tabela 31/ grafikona 20/ referenci 221

Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Sudska medicina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	forenzička toksikologija; forenzička medicina; etanol + analiza; telesne tečnosti; leš; sadržaj alkohola u krvi; gasna hromatografija-masena spektrometrija; čuvanje biološkog materijala
UDK	616.15:547.262]:543.544.3 340.66/.67
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Određivanje koncentracije etanola u telesnim tečnostima, pre svega u krvi, neophodan je uslov da bi se ustanovio uticaj alkoholemije na psihomotorne sposobnosti. Poznavanje stabilnosti lekova, droga i metabolita u biološkim uzorcima je od ključne važnosti kada se ukaže potreba za ponovljenom analizom i evaluacijom rezultata u sudskom postupku.</p> <p>Osnovni ciljevi ovog rada su da se uz pomoć HS-GC metode (hedspejs gasna hromatografija) ustanovi da li postoji statistički značajna promena koncentracije etanola u uzorcima krvi dobijenih od živih osoba i u biološkim uzorcima sa autopsijskog materijala. Na osnovu rezultata potrebno je bilo utvrditi u kojem tipu uzorka uzetog sa lešnog materijala postoji najmanja promena koncentracije tokom perioda čuvanja uzorka.</p> <p>Istraživanje je bilo otvoreno, randomizirano i prospektivnog tipa.</p>

	<p>Biološki uzorci krvi i mokraća živih osoba i lešnog materijala (krv, mokraća i staklasto telo) uzimani su metodom slučajnog izbora, u rasponu alkoholemije od 0,1 mg/ml do 5 mg/ml. Nakon inicijalne dvostruke analize, jedan biološki uzorak čuvan je u trajanju od 180 dana, dok je drugi otvaran i analiziran nakon 60, 120 i 180 dana. Ukupan broj analiza alkoholemije u krvi živih osoba iznosio je 500. Ukupan broj analiza koncentracije etanola u krvi, mokraći i staklastom telu sa leševa iznosio je 360. Etanol je u uzorcima krvi živih osoba, kao i u biološkim uzorcima sa autopsijskog materijala određivan metodom HS GC.</p> <p>Tokom čuvanja bioloških uzoraka u periodu od šest meseci ustanovljeno je da je došlo do značajnog smanjenja koncentracije etanola u svim analiziranim uzorcima, nezavisno od njegovog porekla. Promena koncentracije etanola tokom čuvanja u zavisnosti je od tkivne vrste uzorka, inicijalne alkoholemije, dužine čuvanja, integriteta vijala i čepova, temperature, odnosa tečne i gasne faze, prisustva konzervansa i potencijalnog intermitentnog otvaranja radi analiza.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	28.03.2013.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član:</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------

University of Novi Sad
Faculty of Medicine

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. thesis
Author: AU	Miljen Maletin
Mentor: MN	Professor Goran Stojiljković, PhD
Title: TI	Medicolegal aspects of ethanol concentration changes in biological samples under controlled laboratory conditions
Language of text: LT	Serbian latin.
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Chapter number 8/ pages 126/ pictures 8/ tables 31/ graphs 20/ references 221
Scientific field SF	Medical science

Scientific discipline SD	Forensic medicine
Subject, Key words SKW	Forensic Toxicology; Forensic Medicine; Ethanol + analysis; Body Fluids; Cadaver; Blood Alcohol Content; Gas Chromatography-Mass Spectrometry; Preservation, Biological
UC	616.15:547.262]:543.544.3 340.66/.67
Holding data: HD	Faculty of medicine library, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Determination of ethanol concentration in body fluids, especially blood, is a necessary objective to establish the influence of alcohol on psychomotor skills. Knowing the stability of medicines, drugs and metabolites in biological samples is of crucial importance when there is a need for repeated analysis and result evaluation in court.</p> <p>The main objectives of this work were to determine whether there was a statistically significant change in ethanol concentration in blood samples obtained from living subjects and from autopsy material, by using HS-GC method (headspace gas chromatography). Based on the results it was necessary to determine which type of sample collected from autopsy showed the lowest change in concentration during the storage period.</p> <p>The study was open, randomized and prospective.</p> <p>Biological samples of living person's blood and autopsy biological samples (blood, urine and the vitreous humor) were taken at random, in the level range between 0.1 mg/ml and 5 mg/ml. After an initial duplicate</p>

	<p>analysis, one biological sample was stored for a period of 180 days, while the other was opened and analyzed after 60, 120 and 180 days. Total number of analysis of living person's blood samples was 500. The total number of analysis of autopsy biological samples was 360. All concentrations were determined by HS-GC method.</p> <p>During the storage, results showed that there has been a significant decrease in the concentration of ethanol in all of the analyzed samples, regardless of its origin. The level of this change was dependent on the type of tissue sample, initial alcohol concentration, duration of storage, integrity of the vials and stoppers, temperature, ratio of liquid and gas phases, presence of preservatives and intermittent opening for analysis.</p>
Accepted on Senate on: AS	28.03.2013.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

SADRŽAJ

1. Uvod

1.1.	Pregled problema	1
1.2.	Uticaj akutne alkoholisanosti na psihomotorne funkcije	3
1.3.	Vreme konzumacije i efekti alkohola	6
1.4.	Sudbina etanola u organizmu	9
1.5.	Klinička farmakokinetika etanola	13
1.6.	Određivanje alkoholemije kod živih osoba u kliničke i forenzičke svrhe	18
1.7.	Metode za utvrđivanje etanola u telesnim tečnostima	21
1.8.	Etanol u izdahnutom vazduhu	24
1.9.	Kontrola kvaliteta analize etanola u laboratorijskim uslovima	25
1.9.1.	Preanalitički faktori	26
1.9.2.	Analitički faktori	27
1.9.3.	Postanalitički faktori	27
1.10.	Analiza postmortalnih uzoraka na etanol i interpretacija rezultata	27
1.10.1.	Postmortalno uzorkovanje tkiva za analizu etanola	29
1.10.2.	Vrsta tkiva za postmortalnu analizu etanola	30
1.10.2.1.	Analiza krvi	30
1.10.2.2.	Analiza urina	35
1.10.2.3.	Analiza staklastog tela	37
1.10.2.4.	Nekonvencionalni uzorci	38
1.10.3.	Efekti dekompozicije i kontaminacije uzoraka mikroorganizmima	39
1.10.4.	Problem posmrtna difuzije alkohola	41
1.11.	Zakonska regulativa u Republici Srbiji	42

2. Radne hipoteze	48
3. Ciljevi istraživanja	49
4. Materijal i metode	50
4.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka	54
5. Rezultati	56
6. Diskusija	94
6.1. Analiza rezultata uzoraka krvi živih osoba	95
6.2. Analiza rezultata bioloških uzoraka autopsijskog materijala	98
7. Zaključci	103
8. Literatura	105

1. UVOD

1.1. Pregled problema

Pod terminom „alkohol“ u hemiji se podrazumeva grupa jedinjenja koja poseduju funkcionalnu hidroksilnu – OH grupu (1). U rutinskoj forenzičkoj praksi kao i u kolokvijalnom govoru reč alkohol odnosi se na specifično jedinjenje – etil-alkohol ili etanol, koji spada u grupu alifatičnih ugljovodonika sa kratkim lancem, čija je molekularna formula C_2H_5OH .

Etanol je bezbojna bistra tečnost prijatnog mirisa, specifične težine 0,789 čija je tačka ključanja $78,35\text{ }^{\circ}C$. Etanol se za potrebe pravljenja alkoholnih pića dobija enzimatskom razgradnjom skroba i fermentacijom šećernih rastvora pod dejstvom gljivica kvasnica. Alkoholna pića koja se dobijaju iz voća, povrća i drugih biljaka prirodnim procesom vrenja sadrže veliki broj organskih jedinjenja koja mu daju boju, miris i ukus (metanol, n-propanol, n-butanol, izobutanol i sl.). Industrijski etanol dobija se iz acetilena ili etilena i denaturisan je supstancama neprijatnog mirisa (piridin, metanol, aceton i sl.) da se kao takav ne bi greškom konzumirao (1, 2, 3).

U forenzičkoj praksi etanol se prema poreklu nastanka u organizmu može podeliti na:

- egzogeni – unet u organizam iz spoljašnje sredine, najčešće konzumiranjem alkoholnih pića
- endogeni – stvoren i prisutan u organizmu u sklopu metaboličkih procesa, i
- posmrtni – produkovan nakon smrti, pod dejstvom mikroorganizama

Egzogeni etanol se najčešće unosi konzumacijom alkoholnih pića – vina, piva, rakije, viskija, konjaka, likera i sl. Jačina alkoholnih pića se najčešće izražava u volumen procentima - vol%, i predstavlja odnos čistog etanola u jedinici zapremine pića.

Prekomerna konzumacija alkoholnih pića je oduvek imala važnu ulogu u saobraćajnim nezgodama, kod smrtnih slučajeva koji su posledica povređivanja, utopljenja, samoubistava i u drugim oblicima nasilja registrovanim od strane organa reda, tužilaštva i sudova, kao i u izveštajima urgentnih medicinskih službi (4-10). Zloupotreba alkohola predstavlja važan faktor i u slučajevima nezgoda u kući i na radnom mestu (11-13). Etanol je na vrhu liste psihoaktivnih supstanci koje se analiziraju u toksikološkim laboratorijama (Tabela 1), a analiza alkoholemije i interpretacija nalaza koncentracije alkohola u krvi (BAC, BEC, eng. *Blood Alcohol Concentration, Blood Ethanol Concentration*) predstavlja značajan deo svakodnevnog rada jedne forenzičko-toksikološke laboratorije. (8, 11, 13). Vrsta supstanci kao i učestalost pozitivnog nalaza alkohola u telesnim tečnostima u znatnoj meri zavisi od brojnih socijalno–medicinskih faktora, koji se razlikuju u pojedinim zemljama.

Učestalost	Supstanca	Broj slučajeva	Opis leka/supstance
1	Etanol	2094	Alkoholna pića
2	Paracetamol	564	Antipiretik
3	Diazepam	286	Anksiolitik
4	Citalopram	238	SSRI antidepresiv
5	Morfin (metabolit heroína)	207	Narkotička analgezija
6	Propoksifen	204	Centralna

			analgezija
7	Propiomazin	199	Sedativ/hipnotik
8	Zopiklon	197	Sedativ/hipnotik
9	Kodein	187	Analgezija
10	Alimemazin	139	Neuroleptik/sedativ
11	Ugljen monoksid	139	Toksični gas
12	Karbamazepin	137	Antiepileptik
13	Amfetamin	135	Stimulant
14	Tramadol	121	Analgezija
15	Mirtazapin	120	Antidepresiv
16	Sertralin	117	SSRI antidepresiv
17	Flunitrazepam	109	Benzodiazepin
18	THC	103	Kanabis
19	Venlafaksin	96	Antidepresiv
20	Nitrazepam	93	Benzodiazepin

Tabela 1. Najčešćih 20 supstanci u uzorcima venske krvi uzetih prilikom sudskomedicinskih obdukcija u Švedskoj, tokom 2002.

1.2. Uticaj akutne alkoholisanosti na psihomotorne funkcije

Još u prvoj polovini prošlog veka, u nekoliko naučnih studija analizirani su motorički i kognitivni poremećaji uzrokovani konzumiranjem alkoholnih pića (14, 15, 16, 17). Procena poremećaja ovih funkcija ima ne samo naučni, već i klinički i forenzički značaj, iako je sam postupak ocene visoko varijabilan, i u zavisnosti od brojnih motivacionih, situacionih ali i fizioloških i farmakoloških faktora.

Što se tiče bihevioralnih poremećaja koji nastaju kao posledica akutne konzumacije alkoholnih pića, isti se ogledaju u poremećaju motornih i kognitivnih funkcija, funkcije govora i funkcije vestibularnog sistema.

Etanol dovodi do depresije centralnog nervnog sistema, a kada se govori o poremećaju motoričkih funkcija, najlakše uočljivi su ispadi fine motorne koordinacije. Osnovno, ali i složeno reakciono vreme, u kojem se od subjekta ispitivanja traži da na egzogeni stimulus odreaguje stiskanjem jednog ili više tastera, što zahteva koordinaciju kognitivnih i motoričkih funkcija organizma, relativno je neosetljivo na unos etanola. Neka istraživanja su pokazala potpuno odsustvo ovog efekta sve do količine od oko 0,6-0,7 g/kg unetog etanola (18-24). Sa druge strane, koncentracija etanola već od 0,5 mg/ml ima uticaj na mogućnost praćenja subjekta, pri čemu se od ispitanika traži da pointerom prati kretanje pokretne mete, što zahteva finu motoričku kontrolu i koordinaciju sa brzim pokretima oka (21, 24, 25, 26).

Negativan uticaj alkoholemije jasan je i kada se od subjekta zahteva da izvršava višestruke naredbe simultano (24), što se u svakodnevnom životu ogleda pre svega prilikom vožnje motornih vozila. Statistički podaci ukazuju na to da rizik od saobraćajnih nezgoda značajno raste već pri koncentraciji etanola u krvi od 0,4 mg/ml (27), što je potvrđeno i u kontrolisanim laboratorijskim istraživanjima (25, 28).

Lako uočljiva spoljašnja manifestacija konzumiranja alkoholnih pića predstavlja poremećaj govora, zato što ovakva aktivnost zahteva finu motoričku kontrolu i koordinaciju pokreta usana, jezika i glasnih žica. Promene u govoru su jasno uočljive pri alkoholemiji većoj od 1

mg/ml, dok su efekti nižih koncentracija promenljivi (29, 30). Bez obzira na ovakva ograničenja, procena poremećaja govorne funkcije može da posluži kao dobar terenski skrining test, naročito za pripadnike policije ili drugih organa reda od kojih se zahteva testiranje inkriminiranih subjekata.

Kada se govori o uticaju povišene alkoholemije na vestibularni sistem, postoje dve osnovne vrste poremećaja koje se kliničkim pregledom mogu uočiti: pozicioni alkoholni nistagmus (PAN) i nistagmus pri horizontalnom pogledu (eng. *Horizontal Gaze Nystagmus*, HGN). Kod osoba kod kojih je alkoholemija iznad 0,4 mg/ml često se uočava PAN tipa I, koji podrazumeva nistagmus udesno kada je glava savijena u desnu stranu, tj. nistagmus ulevo, kada je glava savijena na levu stranu. PAN tipa II javlja se između 5 i 10 časova nakon konzumacije i karakteriše se nistagmusom suprotnog smera od onog kod PAN tipa I (31). Što je brža konzumacija alkoholnog pića, brže se javlja PAN I (32). Oba tipa nistagmusa posledica su efekta alkoholemije na funkcionisanje semicirkularnih kanala (33).

HGN nistagmus podrazumeva trzajne pokrete očne jabučice u smeru pogleda, kada je glava u uspravnom položaju, i obično je uočljiv pri BAC iznad 0,8 mg/ml. Procena ugla pod kojim se javlja HGN može biti dobar test za inicijalnu procenu alkoholisanosti, što je potvrđeno i u kliničkim studijama. Tako se HGN javlja na oko 45° pri BAC od 0,5 mg/ml, na 40° pri BAC 1 mg/ml, a na 35° ukoliko je BAC 1,5 mg/ml (34).

Prilikom procene kliničkih parametara ne sme se smetnuti postojanje visoke individualne varijabilnosti. Prva i najvažnija činjenica je da se kod osoba prilikom konzumacije alkoholnih pića

razvijaju u organizmu različiti stepeni alkoholemije. Takođe, osobe koje češće konzumiraju veće količine alkoholnih pića imaju tendenciju smanjenog ispoljavanja navedenih bihevioralnih poremećaja (17, 35, 36). Postoje razlike u farmakokinetici etanola između osoba muškog i ženskog pola, pre svega zbog različitog sadržaja masti, i niže koncentracije želudačne alkoholne dehidrogenaze kod žena (35, 37). Uprkos tome, istraživanja nisu pokazala da postoji signifikantna razlika između muških i ženskih osoba u bihevioralnim efektima konzumacije alkoholnih pića (38). Malo je istraživanja koja su se bavila uticajem životnog doba na efekte alkohola, te iako su neka od njih ukazala na porast osetljivosti starijih osoba prilikom konzumacije etanola, broj ispitanika i studija je isuviše mali da bi mogao da se izvede pouzdan zaključak, koji bi vodio u smeru da se prvenstveno radi o posledicama efekta starenja na vulnerabilnost CNS ka štetnim efektima etanola (39, 40).

1.3. Vreme konzumacije i efekti alkohola

Efekti povišene koncentracije etanola znatno variraju u odnosu na vreme proteklo od početka konzumacije, a najčešće se opisuju kao bifazični (41). Ovo podrazumeva da sedativnom dejstvu prethodi stimulacija centralnog nervnog sistema, pri čemu postoje značajne individualne varijacije u vrsti i stepenu stimulativnog efekta (42). Stimulacija se najčešće ogleda u pojačanoj pričljivosti, euforiji, pojačanoj motoričkoj aktivnosti, itd. Ovakvi efekti uočljivi su pri početku pijenja, u fazi porasta alkoholemije, i to pri koncentraciji etanola u krvi od 0,2-0,3 mg/ml, pa sve do 1 mg/ml (41), pri čemu pojedina istraživanja ukazuju na to da su stimulatívni efekti izraženiji ukoliko je brži porast koncentracije u krvi (43). Sedativni efekat alkoholemije javlja se pri koncentracijama većim od 0,6-0,8 mg/ml, i to najpre u fazi eliminacije etanola iz organizma. Kod alkoholičara i

osoba sa povišenom tolerancijom na etanol, ovakvi efekti se javljaju pri koncentraciji od oko 1 mg/ml (41).

Istraživanja su takođe pokazala da su poremećaji ponašanja izraženiji u fazi porasta alkoholemije nego u fazi eliminacije, i to pri različitim koncentracijama i primenom različitih testova, što se može objasniti pre svega efektom akutne tolerancije.

Postoje različiti tipovi tolerancije na etanol (36). Metabolička tolerancija podrazumeva stečeno ubrzanje metabolizma etanola, tj. eliminaciju iz organizma. Funkcionalna tolerancija je termin koji opisuje stečeno smanjenje efekta određenog stepena alkoholemije na ispitivanu osobu. Pod akutnom tolerancijom podrazumeva se smanjenje efekta alkoholemije prilikom jednokratnog pijenja, nezavisno od koncentracije etanola u krvi. Jasno je da zbog ovakvog efekta stepen poremećaja bihevioralnih funkcija nije samo u zavisnosti od BAC već i od vremena tokom kojeg je ljudski organizam bio izložen etanolu, a prilikom jednokratne konzumacije.

Mamurluk je termin kojim se opisuje averzivno stanje nastalo dan nakon konzumacije veće količine alkoholnog pića, a karakteriše se disforijom, iritabilnošću, glavoboljom, mučninom, vrtoglavicom i dehidracijom. Većina navedenih poremećaja su subjektivnog karaktera, a kontrolisane studije pokazale su suprotstavljene rezultate kada su u pitanju bihevioralni poremećaji tokom mamurluka (44, 45), što upućuje na zaključak da su efekti ne samo posledica prethodne konzumacije alkohola, već i propratnih faktora tokom mamurluka, kao što su neispavanost, zamor, promena raspoloženja i motivisanosti za obavljanje ciljanih zadataka u datoj fazi.

Kada se govori o testovima kojima se procenjuje stepen alkoholisanosti, postoji nekoliko poželjnih karakteristika koje bi ovi

testovi morali da ispune da bi se koristili bilo u svrhu ciljanih istraživanja, bilo tokom svakodnevnog rada (npr. za pripadnike policije i organa reda). Testovi moraju da prikažu rezultate na adekvatan i jasan način (binarno, ordinarno ili kvantitativno), moraju da budu primenljivi u praksi, da budu pouzdani, validni, senzitivni i specifični.

Što se prikaza rezultata testova tiče, poželjno je da budu kvantitativni, da bi mogao da se prati efekat različitih nivoa BAC.

Primenljivost u praksi pre svega podrazumeva da se testovi lako izvode i da su razumljivi za ispitanike.

Pouzdanost znači da testovi daju rezultate koji su lako ponovljivi prilikom novog ispitivanja, a pri različitim BAC.

Validnost testa označava da li test zaista precizno meri ono čemu je i namenjen. Naime test može da bude pouzdan ali ne i validan. Npr. merenje telesne mase je pouzdan i lako ponovljiv test, ali nije validan u proceni uticaja alkoholemije na ponašanje ili motoričke funkcije ispitanika.

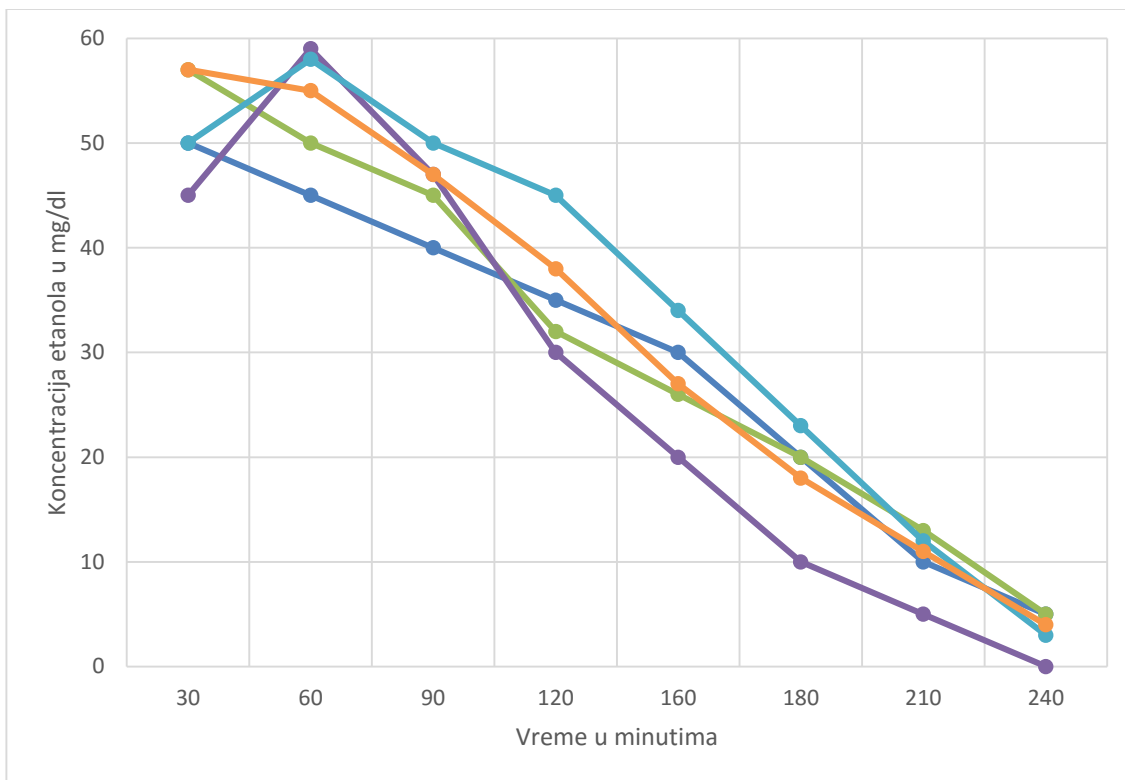
Senzitivnost je mogućnost testa tj. ispitivanja da uopšte otkrije poremećaj, pri čemu testovi alkoholisanosti najčešće nisu u mogućnosti da otkriju efekte ukoliko je BAC ispod 0,1 mg/ml, a kod dugogodišnjih konzumenata i pri mnogo većim koncentracijama.

Specifičnost je termin kojim se opisuje da li su rezultati testiranja posledica povišene alkoholemije, ili mogu da budu rezultat npr. umora, psihofizičkog stresa ili individualnih varijacija u kognitivnoj ili motoričkoj sferi ispitivanja.

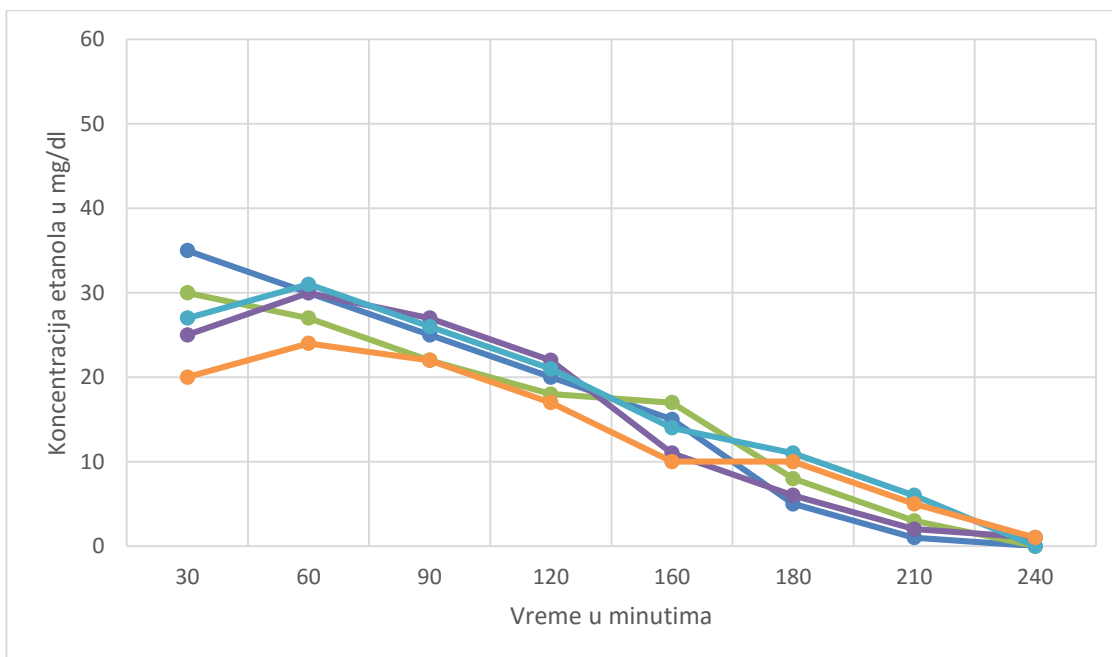
U SAD su u upotrebi tri osnovna testa za procenu trezvenosti ispitanika na terenu, tzv. FST (eng. *Field Sobriety Tests*). To su test stajanja na jednoj nozi, test hodanja i okreta i testiranje horizontalnog nistagmusa (46). Rezultati ovih testova su praktično upotrebljivi, sami testovi su jednostavno primenljivi na terenu, i svi imaju adekvatan stepen validnosti. Testiranje horizontalnog nistagmusa ima i visok stepen specifičnosti i senzitivnosti, što nije slučaj i sa druga dva testa. U ovom polju istraživanja postoji veliki prostor za razvoj novih načina ispitivanja, što bi svakako imalo značajne i pozitivne forenzičke implikacije.

1.4. Sudbina etanola u organizmu

Etanol je mali polarni molekul niske molekularne mase i naboja, što mu omogućava lak prolazak kroz biološke membrane. Nakon ingestije deo etanola se brzo resorbuje kroz želudačnu sluznicu ali je apsorpcija mnogo veća u gornjoj polovini tankog creva zahvaljujući velikoj površini mikrovila u sluzokoži. Brzina i obim resorpcije su smanjeni ukoliko se u želucu nalazila hrana pre konzumacije alkoholnih pića (47). Krv iz gastrointestinalnog trakta i portne vene prolazi kroz jetru, a zatim dolazi do srca odakle se distribuira u sistemska cirkulaciju. Proces razgradnje male količine alkohola pre distribucije u sistemska cirkulaciju naziva se metabolizam prvog prolaza (eng. *First Pass Metabolism*, FPM), i rezultat je aktivnosti želudačne alkoholne dehidrogenaze (47). Ovaj proces je najizraženiji prilikom konzumacije manjih količina etanola, a naročito ukoliko je pijenju prethodio unos hrane, zbog dužeg kontakta etanola za želudačnom sluznicom. (48, 49). Uzimanje hrane pre konzumacije alkohola usporava resorpciju etanola i smanjuje BAC u odnosu na pijenje na prazan želudac (50 - 53) (slika 1, slika 2).



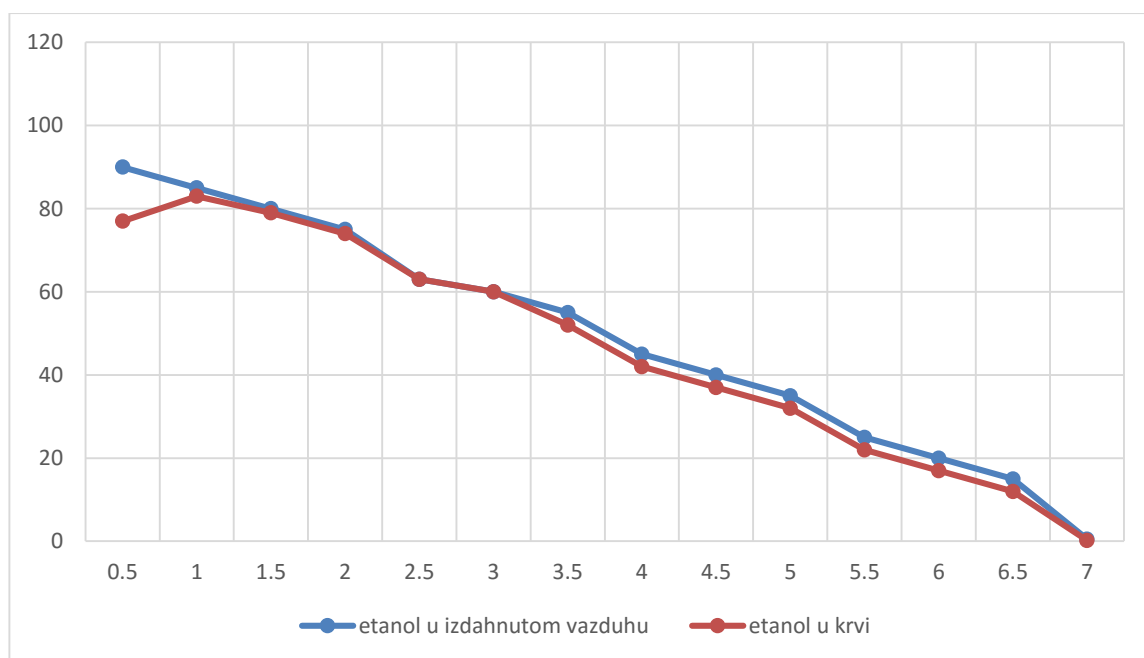
Slika 1. Kriva koncentracije etanola unetog na prazan želudac

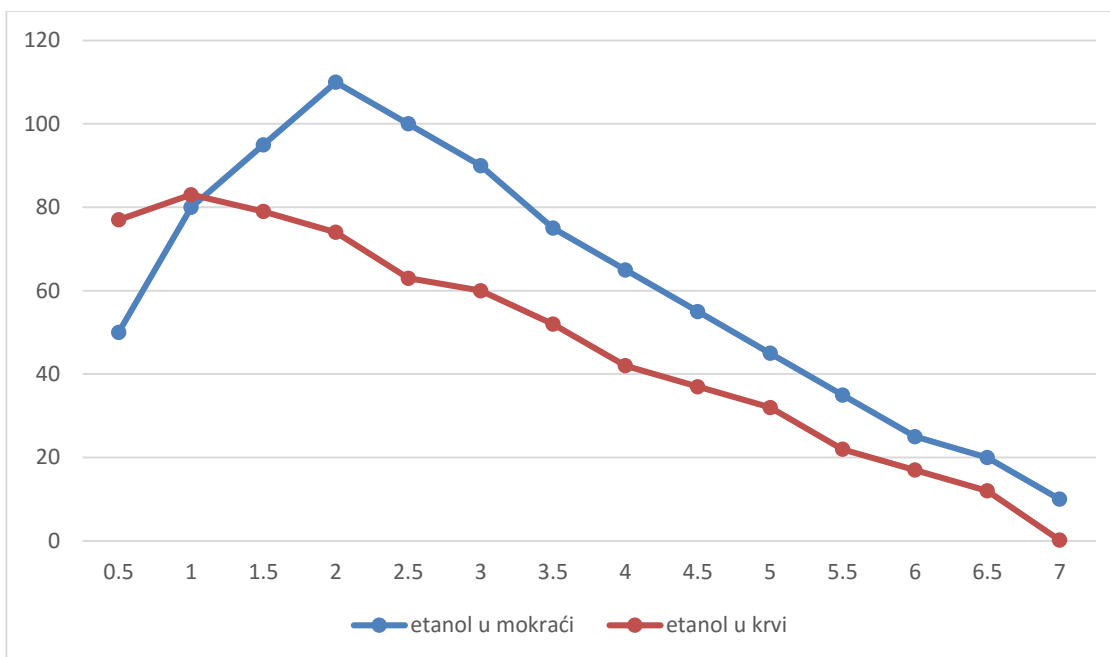
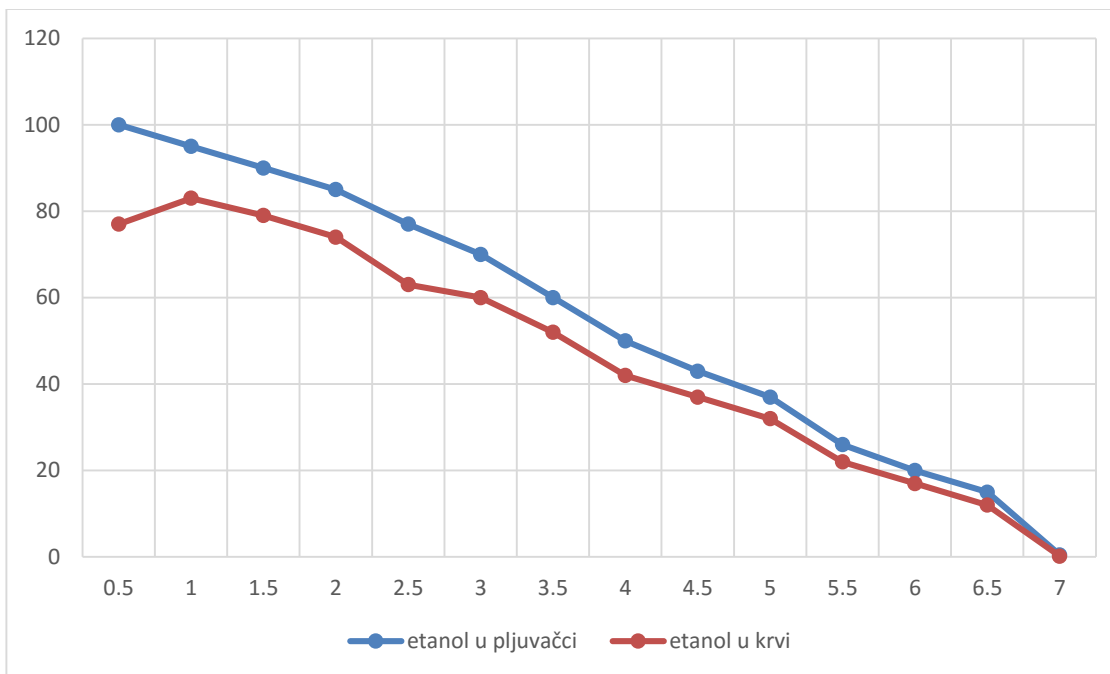


Slika 2. Kriva koncentracije etanola unetog nakon konzumiranja hrane

Nivo etanola u krvi u ovakvim slučajevima je znatno niži od očekivanog, sa velikim inter i intraindividualnim varijacijama u farmakokinetičkim profilima. Nije poznato da li je ovo rezultat FPM ili ubrzanog metabolizma neposredno nakon pijenja a tokom faze apsorpcije.

Etanol se u sistenskoj cirkulaciji uniformno distribuira bez vezivanja za proteine plazme. Najviša koncentracija alkohola u krvi i vreme za koje se ona postiže veoma varira od osobe do osobe, i zavisi od mnogo faktora. U studiji na 48 zdravih odraslih muškaraca koji su konzumirali 0,68 g/kg etanola u formi viskija na prazan želudac, najviša koncentracija u kapilarnoj krvi postignuta je za 10, 40, 70 i 100 minuta kod 23, 14, 8 i 3 osobe (54). Najveći značaj u ovoj varijabilnosti pridaje se količini, koncentraciji popijenog pića, brzini pijenja, a pre svega brzini želudačnog pražnjenja (55). Koncentracija etanola u telesnim tečnostima nakon postizanja dinamičkog ekvilibrijuma zavisi od sadržaja vode, perfuzije tkiva, kao i drugih faktora (56). (slika 3).





Slika 3. odnos koncentracije etanola u krvi, mokraći i pljuvački

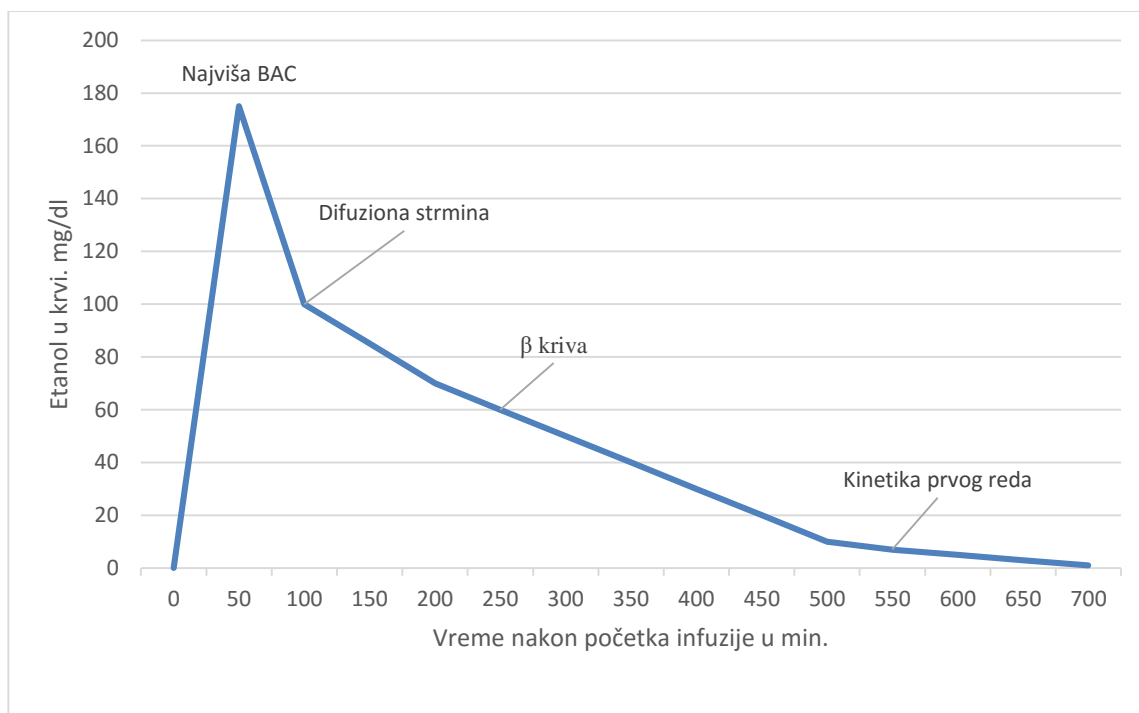
Najveći deo unetog alkohola (95 do 98%) eliminiše se metaboličkim putem u jetri, delovanjem klase I enzima alkoholne dehidrogenaze (ADH) (47). Do 5% etanola eliminiše se u nepromenjenom obliku putem izdahnutog vazduha, mokraće i znoja,

a veoma mala frakcija i konjugovana sa glukuronskom kiselinom (57). Mala količina etanola se metaboliše pre ulaska u sistemsku cirkulaciju (metabolizam prvog prolaza), o čemu je već bilo reči, iako je kvantitativni značaj ovakve eliminacije još uvek pod znakom pitanja (58).

Kada BAC pređe 0,6 mg/ml u metabolizam etanola uključuju se mikrozomalni enzimi - CYP 450IIE1, koji imaju veću Mihaelis Mentenovu konstantu u odnosu na ADH. (K_m od 60 do 80 mg/dl) (59, 60). S obzirom na to da mikrozomalni enzimi učestvuju u metabolizmu mnogih drugih lekova i hemijskih jedinjenja, time se može objasniti mogućnost interakcije etanola sa lekovima kao i toksičnost etanola kod hroničnih alkoholičara (61, 62). Tokom dugotrajne upotrebe alkohola dolazi do de novo sinteze enzima čime se razvija metabolička tolerancija na alkohol, a brzina eliminacije etanola iz krvotoka je dva do tri puta veća (63, 64, 65).

1.5. Klinička farmakokinetika etanola

Farmakokinetika etanola je bila predmet istraživanja brojnih naučnih radova još od 30-tih godina prošlog veka, zahvaljujući raspoloživosti pouzdanih metoda za analizu malih zapremina krvi (50). Tipičan profil odnosa koncentracije etanola u krvi i proteklog vremena, baziran na Widmarkovom modelu (55) može se uočiti na slici 4, koja prikazuje ovakav odnos nakon infuzije 0,80 grama etanola po 1 kg telesne mase.



Slika 4. Tipičan farmakokinetički profil metabolizma etanola

Vrh BAC krive odgovara završetku infuzije, nakon čega nastupa difuziona strmina koja predstavlja period vremena u kojem dolazi do izjednačavanja koncentracije etanola u dobro i u loše prokrvljenim tkivima. Otprilike nakon 90 min BAC počinje da opada konstantnom brzinom, a ovaj deo grafikona se naziva β – kriva. Kada koncentracija u krvi opadne ispod 0,10 mg/ml, približno nakon 450 minuta, eliminacija sledi kinetiku prvog reda koja je koncentracijski zavisna, sa poluvremenom eliminacije od oko 15 minuta (66), a što je posledica prestanka zasićenja ADH enzima.

Kriva promene koncentracije etanola u funkciji vremena je prvi put opisana od strane Erika Vidmarka (51), i može se predstaviti na sledeći način:

$$C_t = C_0 - \beta t$$

- C_t predstavlja koncentraciju etanola u određenom vremenskom momentu u fazi eliminacije
- C_0 je ekstrapolacijom dobijena maksimalna koncentracija etanola u slučaju da se resorbuje celokupna količina popijenog alkohola a bez značajnije eliminacije.
- **Faktor β** predstavlja brzinu eliminacije etanola iz krvi
- **t** je vreme u minutima.

Brzina eliminacije etanola iz krvi kod osoba koje umereno konzumiraju alkoholna pića je između 0,10 i 0,20 mg/ml/1h, sa srednjom vrednošću od 0,15 mg/ml/1h (54, 55). Kod alkoholisanih vozača i osoba na detoksikacionoj terapiji prosečne vrednosti su nešto veće i iznose 0,19 i 0,22 mg/ml/h (67, 68), što je rezultat stimulacije produkcije mikrozomalnih P4502E1 enzima. Ovi enzimi imaju višu Mihaelisovu konstantu K_m (60-80 mg/dl) u odnosu na ADH (2-5 mg/dl), tako da je pad koncentracije kod alkoholičara strmiji u odnosu na opštu populaciju. U kontrolisanim studija srednja vrednost beta eliminacionog faktora kod alkoholičara iznosila je u proseku 0,22 mg/ml, sa rasponom od 13 do 36 mg/ml. Oboljenja jetre, npr. hepatitis ili ciroza, nemaju uticaj na eliminaciju (47, 68, 69).

Brzina eliminacije se ne menja značajno u odnosu na doba dana, ali je gastrično pražnjenje ubrzano u jutarnjim satima, što se ogleda u tome da je vršni BAC za oko 1/3 veći i postiže se brže ukoliko je alkohol konzumiran u periodu između 07,15 i 07,45 časova ujutru, u poređenju sa istim vremenskim periodom u večernjim časovima. Pušenje cigareta usporava gastrično pražnjenje, te posledično usporenje apsorpcije etanola kod pušača rezultira i nešto nižim vršnim BAC vrednostima (70,71).

Uzimajući u obzir različite procenete vode u telu i u krvi, jedinice kojima se izražava maseno - maseni ili maseno - zapreminski odnos etanola u krvi tj. telu, kao i uzorke korišćene u laboratoriji za utvrđivanje BAC (plazma ili puna krv), još je Vidmark odredio faktor distribucije – r , koji predstavlja odnos između količine etanola u telu i u krvi; novija istraživanja su pokazala da su prosečne vrednosti ovog faktora kod muških osoba 0,7 l/kg, a kod ženskih osoba 0,6 l/kg, sa verovatnoćom od 95% (47). Distribucionni faktor pre svega zavisi od životnog doba i proporcije masnog tkiva u organizmu. Vrednosti ovog faktora zavise i od toga da li su za potrebe analize uzeti uzorci pune krvi ili plazme (72).

Poznajući faktor distribucije može se matematičkim putem odrediti odnos između količine etanola u telu i maksimalne koncentracije u krvi, što se predstavlja formulom

$$C_0 = A/(p \times r), \text{ gde je}$$

- **A** - količina resorbovanog alkohola u organizmu u gramima,
- **p** - telesna masa u kg
- **r** - Vidmarkov redukcionni faktor.

Ova jednačina omogućava ekstrapolaciju koncentracije etanola u krvi na osnovu poznavanja količine i vrste popijenog i resorbovanog alkoholnog pića i obrnuto.

U praksi, kada se na osnovu količine popijenog pića preračunava BAC, neophodno je pretpostaviti da se absorbovalo 100% unetog alkohola, te da se u momentu uzorkovanja sva količina alkohola distribuirala po perifernim tkivima, što se, naravno, u praksi nikada ne dešava. Takođe velika varijabilnost redukcionnog faktora dovela je do eksperimentalnih rezultata gde je konstatovana

individualna varijabilnost najmanje 20% sa stepenom poverenja od 95%, na nasumično 100 odabranih ispitanika (73). Uprkos tome, može se reći da je Vidmarkova računaska metoda za retrogradno preračunavanje alkoholemije ili količine unetog alkohola i dalje dominantna u sudskomedicinskoj praksi (55). Ovo je naročito važno kod unosa malih količina etanola, nakon obroka, jer je u ovim okolnostima raspoloživost etanola smanjena i do 60% (74).

Osim Vidmarkovog kinetičkog modela postoje istraživanja koja se baziraju na Mihaelis–Mentenovoj kinetici, drugim modelima saturacije, a u poslednje vreme postoje istraživanja kinetike etanola bazirana na trokompartmanskim i nekompartmanskim metodama (75-84).

Endogeni etanol u organizmu nastaje spontanom produkcijom u sklopu različitih metaboličkih procesa, i meren metodom gasne hromatografije ne iznosi više od 0,03 mg/ml. U Japanu je kod izvesnog procenta osoba ustanovljeno da pod uticajem gljivice *Candida albicans*, koja čini normalu floru gastrointestinalnog trakta, u crevima može da nastane značajna fermentacija ugljenih hidrata i sledstvena spontana produkcija većih količina etanola, što je poznato pod imenom sindrom sopstvene pivare (eng. auto-brewery syndrome) (85).

Postmortalni etanol u lešu nastaje u sklopu posmrtnih promena – autolize, truljenja i sl., dejstvom mikroorganizama (pre svega gljivice *Candida albicans*) koji s jedne strane izazivaju alkoholno vrenje ugljenih hidrata, a s druge strane u sklopu lešnih promena dolazi do razgradnje ADH, čime se pospešuje akumulacija etanola u tkivima.

1.6. Određivanje alkoholemije kod živih osoba u kliničke i forenzičke svrhe

Još krajem XIX veka vršeno je merenje koncentracije etanola u biološkim uzorcima kao što su puna krv, plazma, serum urin, pljuvačka. Tokom decenija razvoj ovih metoda doveo je do toga da su one postale sofisticirane, senzitivne i veoma precizne (86).

Za razliku od mnogih laboratorijskih analiza, merenje koncentracije alkohola u tkivima ima duboko ukorenjene socijalne i pravne implikacije. Postoji jasna veza između stepena alkoholemije i psihomotornih poremećaja, što poseban značaj ima u saobraćajnim nezgodama, ali i kod povreda na radu, u domaćinstvu itd. Shodno tome, zakonodavstvo različitih zemalja propisuje najviši dozvoljeni nivo etanola u krvi za vozače amatere, koji se kreće od 0,20 mg/ml u Švedskoj, 0,50 mg/ml u većini evropskih zemalja, do 0,80 mg/ml u SAD, Kanadi i Velikoj Britaniji (87). U Srbiji Zakon o bezbedosti saobraćaja na putevima (skr. ZOBS) propisuje da gornja dozvoljena granica alkoholemije iznosi 0,3 mg/ml (88-93). Ovakva zakonska regulativa ima i ekonomski aspekt, jer osiguravajuća društva mogu da ne priznaju naplatu štete ukoliko je kod vozača nađena veća koncentracija etanola od dozvoljene.

Osim forenzičkog i pravnog aspekta, brza, pouzdana i precizna metodologija za određivanje alkoholemije neophodna je i u kliničke svrhe, pre svega na odeljenjima urgentne i intenzivne medicine. Sa kliničkog aspekta neophodno je prepoznati da li kod pacijenata u besvesnom stanju npr. postoji visoka alkoholemija, ili je koma posledica npr. intrakranijalnog krvarenja, njihove međusobne kombinacije i sl. Prisustvo intrakranijalnih hematoma vrlo često iziskuje hitnu hiruršku intervenciju, a određivanje alkoholemije u

znatnoj meri pomaže u diferencijalnoj dijagnostici besvesnih stanja (94). Osim neurotraume i komatoznih stanja koja su u vezi sa intrakranijalnim poremećajima, analiza alkoholemije je od velike važnosti i za razlikovanje drugih, često mnogo opasnijih intoksikacija (npr. metanolom i etilen glikolom), jer se na osnovu analize donosi odluka o invazivnom terapijskom pristupu – hemodijalizi, kojom se odstranjuju toksični produkti metabolizma ovih supstanci – mravlja kiselina kod metanola, oksalna kiselina kod etilen glikola (95).

Kada se govori o određivanju alkoholemije, a naročito interpretaciji dobijenih rezultata, potrebno je razlikovati postupke i problematiku kod kliničkih uzoraka dobijenih od živih osoba, i postmortalnih uzoraka, o čemu će se posebno govoriti.

Jedna od važnih razlika prilikom određivanja alkoholemije u kliničke i forenzičke svrhe je adekvatna upotreba mernih jedinica i njihov međusobni odnos. U kliničkim hemijskim laboratorijama koriste se jedinice po SI sistemu, u kojem se alkoholemija izražava u mmol/L ili mol/L, gde je mol jedinica mase a litar zapremine. U sudskomedicinskim toksikološkim laboratorijama se pak koncentracija etanola izražava ili kao maseno zapreminski odnos (mg/dL, g/L, g/dL ili mg/ml), ili kao maseno maseni odnos (g/kg ili mg/g). Maseno maseni odnos je numerički manji od maseno – zapreminskog za oko 5,5% zato što je specifična težina pune krvi u proseku 1,055 (1 mL pune krvi ima masu od 1,055g), tako da je koncentracija etanola u krvi od 1mg/ml ekvivalent koncentraciji od 1,055 g/kg tj. 21,7 mmol/L. Tabelarno je dat prikaz različitih jedinica koje se koriste u kliničke i u forenzičke svrhe u određivanju alkoholemije može se analizirati tabelarno:

mg/ml ili g/l	mg/100ml ili mg/dl	g/100ml ili g%	g/kg ili mg/g	mU ili mmol/l
0,50	50	0,05	0,47	10,8
0,80	80	0,08	0,76	19,1
1,00	100	0,1	0,95	21,7
2,00	200	0,2	1,89	43,4
5,00	500	0,5	4,74	108,6

Tabela 2. Međusobni odnosi različitih mernih jedinica za izražavanje alkoholemije

Kada se uzorci krvi analiziraju u forenzičke svrhe obično se vrše dve ili čak tri analize istog uzorka, da bi se sa što većom verovatnoćom isključila greška u metodi. Na osnovu određivanja srednje vrednosti moguće je doneti zaključak o intervalu poverenja od 95%, 99% ili 99,9%, u zavisnosti od potrebe za većim ili manjim stepenom preciznosti (96). U kliničkoj praksi ovo nije slučaj, već se najčešće kao vrednost alkoholemije uzima rezultat jedne analize, a varijabilnost ili nepreciznost analitičke metode se prati preko koeficijenta varijacije (CV%) koji potiče od analiziranja kalibracionog standarda sa uzorcima nepoznatog porekla (97).

Druga razlika u radu kliničkih i forenzičkih laboratorija je tip uzoraka koji se analizira. Dok se sudskomedicinskim laboratorijama dostavljaju uzorci pune krvi koja je često hemolizirana ili sa prisustvom ugrušaka, u kliničkim laboratorijama su veoma česti uzorci plazme ili seruma. Puna krv, plazma i serum se između ostalog razlikuju u sadržaju vode (prosečno 80,1% vode za punu krv, 91,8% za plazmu i serum). Stoga se rezultati alkoholemije dobijene analizom plazme ili seruma ne bi smeli a priori koristiti u sudske svrhe, bez

prethodne analize dobijenih rezultata od strane sertifikovane forenzičko-toksikološke laboratorije. (98). Prilikom eksperimentalne analize alkoholemije u punoj krvi i plazmi, kod zdravih ispitanika i nakon konzumacije 0,30 g/kg etanola, dobijene krive uvek pokazuju više vrednosti u plazmi nego u punoj krvi, što je i očekivano zbog različitog sadržaja vode. U istom radu odnos između koncentracije etanola u plazmi i u punoj krvi iznosio je 1,14:1 (99).

Po nekim autorima kao što je Rejni (100), ukoliko se koncentracije etanola u plazmi ili serumu koriste u forenzičke svrhe neophodno je koristiti odnos od 1,22 koji odgovarala intervalu od $\pm 2SD$, a ne 1,14 zbog mnogobrojnih mogućih bioloških i analitičkih varijacija tokom analiza.

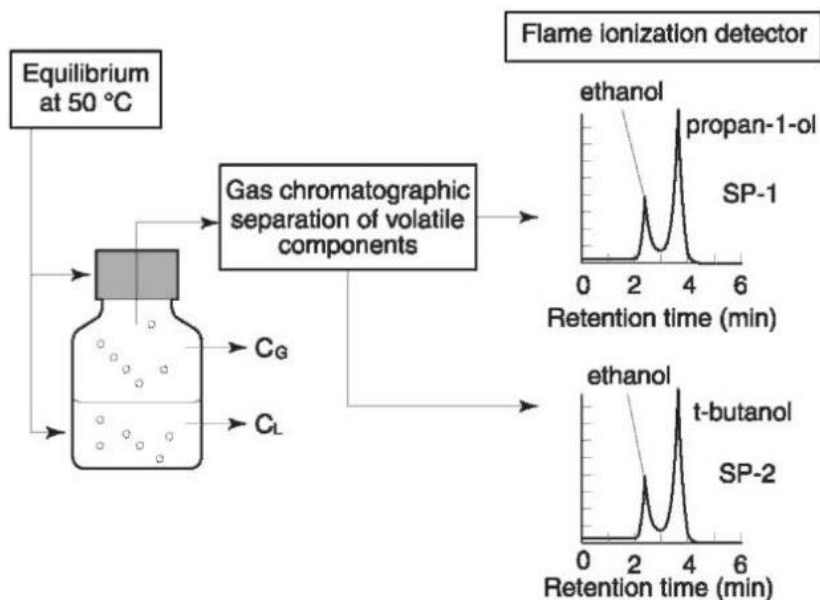
1.7. Metode za utvrđivanje etanola u telesnim tečnostima

Prva kvantitativna metoda za utvrđivanje koncentracije alkohola u krvi u forenzičkoj praksi razvijena je davne 1922. od strane Vidmarka, i bazirala se na hemijskoj reakciji oksidacije. Vidmarkova metoda nije bila specifična za etanol, već je davala pozitivan rezultat i na druge isparljive supstance kao što su etar, metanol ili aceton. Ove analitičke metode su danas zastarele i ne koriste se ni u kliničkim niti u forenzičkim laboratorijama.

Nakon otkrića enzima alkoholne dehidrogenaze, razvile su se tzv. enzimatske, ili ADH metode za utvrđivanje alkoholemije. Ove metode su bile selektivnije u odnosu na oksidativnu metodu, ali su i dalje davale pozitivan rezultat na prisustvo drugih primarnih alkohola (npr. n-propanol), serumskih laktata ili laktatne dehidrogenaze, što je za posledicu imalo lažno visoke rezultate, (101, 102).

Danas je metoda izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu etanola u telesnim tečnostima gasna hromatografija (GC) sa plameno jonizujućim detektorom (FID), kako u forenzičko-toksikološkim, tako i u kliničkim laboratorijama (86), uz upotrebu ili direktnog injektovanja ili hedspejs - headspace uzorkovanja (HS) (103, 104).

Hedspejs uzorkovanje ima prednost u odnosu na direktno injektovanje jer ne dolazi do propterećenja hromatografskih kolona isparljivim sastojcima krvi. Prilikom upotrebe HS-GC metode mora se voditi računa da se minimizira ili eliminiše matrix efekat, a prilikom upotrebe etanola kao standarda za kalibraciju instrumenta i kontrolu preciznosti (105,106). Ovo se najbolje postiže razblaživanjem uzorka krvi u odnosu 1:5 ili 1:10 vodenim rastvorom internog standarda kao što je npr. n-propanol ili t-butanol. Druga tehnika, tzv. isaljavanja, zasniva se na zasićenju bioloških uzoraka i vodenog standarda neorganskim solima, nije preporučljiva u svakodnevnoj praksi, ali može naći primenu ukoliko se analiziraju izuzetno male količine isparljivih supstanci u uzorku (107).



Slika 5. Shematski prikaz hedspejs analize uz upotrebu dva interna standarda

Biološki uzorci koji se šalju na analizu trebalo bi da se analiziraju dva puta, najbolje na dva različita hromatografska sistema, čime se omogućavaju različita vremena retencije za etanol i interni standard. Moguće je kao interne standarde na dva sistema koristiti n-propanol i t-butanol, tim pre što je kod posmrtnih uzoraka moguće stvaranje propanola dokom truljenja i dekompozicije (108).

Preciznost ovakve rutinske analize je visoka, sa intralaboratorijskim varijacijama ispod 1%, a interlaboratorijskim 3-4% (109). Varijacije u vrednostima alkoholemije u uzorcima dobijenim venepunkcijom iz različitih delova tela su pak značajnije, o čemu se mora voditi računa kada se ovi rezultati interpretiraju u sudske svrhe, poređenjem sa zakonski dozvoljenom koncentracijom etanola u krvi (110).

1.8. Etanol u izdahnutom vazduhu

Mala količina unetog etanola se eliminiše iz organizma u nepromenjenom obliku, putem izdahnutog vazduha, što predstavlja osnovu za brzo i neinvazivno merenje alkoholemije. Na sličan način moguće je merenje koncentracije i drugih isparljivih supstanci u krvi, sa posledičnom primenom u kliničkoj i dijagnostičkoj medicini (111, 112). Ipak, glavna primena ove metode je u testiranju vozača na prisustvo alkohola u organizmu i to od strane policije na mestu saobraćajne nezgode. Ova metoda je u SAD od skora našla primenu i u testiranju radnika na radnom mestu, a u svrhu skrininga (86, 113). Postoje dve osnovne kategorije instrumenata koje se koriste ili za kvalitativno dokazivanje prisustva etanola u izdahnutom vazduhu/organizmu, ili za kvantitativno utvrđivanje njegove koncentracije.

Aparati koji se koriste za skrining etanola u sebi sadrže elektrohemijske senzore koji oksidišu etanol u izdahnutom vazduhu do acetaldehida, pri čemu nastaje oslobađanje elektrona – električne struje, čiji je napon direktno proporcionalan koncentraciji etanola u izdahnutom vazduhu. Aceton ne daje lažno negativne rezultate, ali su oni mogući ukoliko postoji visoka koncentracija metanola, ili izopropanola, koji pokreću istu hemijsku reakciju (114, 115).

Aparati koji se koriste na terenu od strane policije i čiji se rezultati mogu koristiti u dokaznom postupku na sudu, svoj rad baziraju na apsorpciji infracrvenih zraka talasne dužine 3,4 μm i 9,5 μm , koji odgovaraju C-H i C-O vibracionom rastezanju atomskih veza unutar molekula etanola (116). Selektivnost na etanol može biti povećana kombinacijom sa elektrohemijском reakcijom. Jedan od

takvih aparata koji se koriste i u našoj državi od strane pripadnika MUP-a je Dreger Alcotest® 7410.

Pre samog testiranja inkriminisanog subjekta neophodan je petnaestominutni opservacioni period, kako bi se apsorbovao sav etanol koji je eventualno konzumiran neposredno pre ispitivanja (117).

Generalno je prihvaćeno da odnos koncentracije etanola u krvi (BAC) i u izdahnutom vazduhu (BrAC) iznosi 2100:1, što je u nekim zemljama kao što su SAD unešeno i u zakonsku legislativu (116).

Empirijske studije su pak pokazale da ovaj odnos daje rezultate koji su za oko 10% niži od BAC u venskoj krvi 1-2 sata nakon prestanka pijenja (118), te je kalibracija aparata preciznija ukoliko se kao odnos koristi vrednost od 2300:1.

Ukoliko se rezultati dobijeni upotrebom alkotestiranja na ovaj način koriste u kliničke svrhe za procenu koncentracije etanola u serumu i plazmi, odnos mora biti još veći, oko 2600:1, zbog toga što puna krv ima oko 14% manje etanola u odnosu na plazmu ili serum.

Danas u mnogim zemljama postoje odvojeni zakonski limiti za koncentraciju etanola u izdahnutom vazduhu – BrAC i za koncentraciju etanola krvi – BAC, čime se izbegavaju inter i intraindividualne varijacije u odnosu ovih koncentracija (116).

1.9. Kontrola kvaliteta analize etanola u laboratorijskim uslovima

Kada se govori o analizi etanola iz bioloških uzoraka za sudske potrebe, neophodno je precizno dokumentovati svaki korak u tzv. lancu nadzora nad uzorkovanjem (eng. *chain of custody*). U

postupanju sa uzorcima svaki korak mora biti zabeležen, kao i sve osobe koje su tokom prikupljanja, transporta, analize i čuvanja uzoraka dolazile u kontakt sa istim. Ukoliko se i više meseci nakon inicijalnog uzorkovanja ukaže potreba za ponavljanjem postupka, neophodno je imati podatke o kalibraciji aparata na dan analize, kao i o sprovedenim unutrašnjim i spoljašnjim testovima kontrole. Svi ovi činiooci u postupanju sa uzorcima koji se šalju na analizu etanola mogu se podeliti na preanalitičke, analitičke i postanalitičke.

1.9.1. Preanalitički faktori

Pacijentu je neophodno pružiti informacije o razlozima uzimanja uzoraka krvi, i ako je potrebno treba od njega dobiti pisani informisani pristanak. Za uzimanje uzorka najčešće se koriste tzv. vakutaner epruvete od 5 ili 10 ml, uz podrazumevanu upotrebu sterilne instrumentacije (igle, braunile u kliničkim uslovima i sl.). Mesto uzorkovanja je najčešće prednja lakatna vena, a potrebno je uzeti adekvatnu količinu krvi ukoliko se ukaže potreba za ponovnim testiranjem. Kožu je potrebno očistiti vodom i sapunom a ne organskim rastvaračem (npr. etar ili izopropanol). Krv ne treba uzeti iz vene u koju je intravenski administriran lek ili infuzija (119). Nakon uzimanja krvi epruvetu treba lagano protresti, da bi se olakšalo rastvaranje hemijskih supstanci koje se koriste kao konzervansi – kalijum oksalata kao antikoagulansa i natrijum fluorida koji sprečava enzimsku, bakterijsku i gljivičnu aktivnost u uzorku. Svaki uzorak mora biti označen imenom i prezimenom osobe od koje je uzet uzorak, a posebno se naznačava vreme uzorkovanja. Takođe moraju biti dostupni podaci o osobi koja je izvršila uzorkovanje. Nakon označavanja, a do inicijalne analize, uzorke je potrebno čuvati u frižideru, na +4 °C.

1.9.2. Analitički faktori

Prilikom prijema uzoraka u laboratoriju isti moraju biti pažljivo ispitani u smislu integriteta epruveta i čepova, kao i da li postoje vidljivi ugrušci u uzorku ili izgled uzorka pobuđuje sumnju na prekomerno razblaženje. Svaka eventualna nezgoda tokom transporta i prijema mora biti notirana, kao i datum i vreme prijema uzoraka. Svaki uzorak mora biti označen odgovarajućim identifikacionim brojem, koji će se koristiti u svakom sledećem koraku laboratorijskog postupanja. Frakcija eritrocita i plazme u uzorku mora biti izmešana pre same analize, a prisustvo neidentifikovanih pikova na hromatogramu može da ukaže na prisustvo drugih isparljivih supstanci u krvi, osim samog etanola.

1.9.3. Postanalitički faktori

Preporuka je da se analiza alkoholemije u istom uzorku vrši najmanje dva puta, pri čemu se notira razlika u dobijenim rezultatima. Ove razlike rastu sa porastom alkoholemije zbog pada preciznosti metode. Neophodno je ustanoviti stepen promene alkoholemije u uzorcima koji se čuvaju u frižideru ili u zamrznutom stanju, te ukoliko se ponovo vrši analiza nakon određenog vremena moguće je izvršiti korekcije ukoliko postoji pravilnost u promenama (120, 121).

1.10. Analiza postmortalnih uzoraka na etanol i interpretacija rezultata

Kako je već navedeno, analiza etanola je na samom vrhu učestalosti u svakodnevnom radu forenzičkih toksikoloških laboratorija. Samo utvrđivanje alkoholemije se ne razlikuje metodološki od onog kod živih ljudi, ali je dobijenu koncentraciju

neophodno interpretirati u odnosu na to da li je osoba zaista konzumirala alkoholna pića pre smrti, u koje vreme, i da li ta koncentracija prelazi zakonske limite (122). Kod donošenja ovakvih zaključaka koji su bazirana na analizi postmortalnih uzorka, zbog velikog broja artefakata koji mogu uticati na konačni ishod, potrebno je biti posebno oprezan (122, 123). Stanje tela u smislu stepena razvoja lešnih osobina i promena, vreme koje je proteklo između smrti i obdukcije, uslovi spoljašnje sredine – temperatura i vlažnost, kao i sama vrsta uzoraka, samo su neki od faktora koji se moraju uzeti u obzir. Pod određenim uslovima etanol se stvara nakon smrti, fermentacijom glukoze od strane mikroorganizama, što predstavlja poseban prolem kod leševa u fazi raspadanja (124, 125). Postmortalna difuzija etanola iz želuca u okolna tkiva kod osoba koje su preminule ubrzo nakon konzumacije alkohola je još jedan od mogućih problema sa kojim se susreću forenzički toksikolozi u radu sa postmortalnim uzorcima (125, 126).

Istorijski posmatrano, prvi radovi na temu postmortalne analize etanola vode poreklo iz nemačkog govornog područja i iz Skandinavije (127, 128), koji su vrlo detaljno opisali problematiku sa kojom se i danas susreću lekari forenzičari i toksikolozi, ali s obzirom na jezičku barijeru, nisu dobili zaslužno internacionalno priznanje. Zahvaljujući ovim pionirskim, ali i svim drugim radovima i istraživanjima koja su usledila, danas se osnovni problemi u analizi posmortalnih uzoraka mogu svrstati u sledeće: uzorkovanje, analiza, vrsta uzorka koja se analizira, problemi mikrobiološke kontaminacije i dekompozicije, problemi postmortalne difuzije i produkcije etanola.

1.10.1. Postmortalno uzorkovanje tkiva za analizu etanola

Na osnovu većeg broja istraživanja zaključeno je da je najbolje mesto za postmortalno uzorkovanje krvi femoralna vena, a ukoliko je moguće potrebno je uzeti urin i staklasto telo za analizu (129). Ovakva standardizacija u znatnoj meri olakšava inter i intralaboratorijska poređenja dobijenih rezultata (130). Preporučena mesta uzorkovanja navedena su u tabeli 2, i to po opadajućem redosledu pouzdanosti. Mnoga zakonodavstva osim koncentracije u krvi kod živih osoba posebno propisuju dozvoljene koncentracije u izdahnutom vazduhu i u mokraći.

Žive osobe	Leševi
Venska krv	Krv iz femoralne vene
Kapilarna krv	Krv iz srčanih šupljina
Plazma/serum	Krv iz ugrušaka
Urin	Urin iz mokraćne bešike
Suze	Staklasto telo
Cerebrospinalna tečnost	Cerebrospinalna tečnost
Pljuvačka	Žuč
Znoj	Sinovijalna tečnost
Izdahnuti vazduh	Mozak, skeletni mišić, jetra

Tabela 3. Podobna tkiva za uzimanje uzoraka radi analize koncentracije etanola kod živih osoba i kod leševa

Epruvete koje se koriste za uzimanje uzoraka i njihov transport do laboratorije trebale bi da sadrže konzervans u vidu kalijum ili natrijum fluorida, kao što je već navedeno u delu koji se odnosi na uzorkovanje kod živih osoba. Međutim, s obzirom na brzu propagaciju

mikroorganizama u telu nakon smrti, standardni vakutaneri od 5 ili 10 ml sadrže otprilike 16 mg NaF, što nije dovoljna količina kod posmortalnih uzoraka, za razliku od živih osoba (131, 132).

Sve epruvete moraju biti adekvatno obeležene, a posebno se mora voditi računa o tome da se u epruveti nalazi što manja količina vazduha da bi se smanjila mogućnost evaporacije. Vakutaneri se do analize čuvaju na temperaturi od 4 °C.

Kao i kod živih osoba, gasna hromatografija sa hedspejs uzorkovanjem je metoda izbora prilikom analiziranja uzoraka, kada se koncentracija etanola precizno može ustanoviti nezavisno od prisustva drugih volatilnih susptanci (acetaldehid, n-propanol, n-butanol). Značaj koncentracija etanola u postmortalnim uzorcima krvi ispod 0,3 mg/ml, a bez analize urina i/ili staklastog tela je upitan.

1.10.2. Vrsta tkiva za postmortalnu analizu etanola

1.10.2.1. Analiza krvi

Od svih uzoraka telesnih tečnosti i tkiva, krv na najbolji način omogućava zaključivanje o tome da li je preminula osoba konzumirala alkohol pre smrti i da li je u momentu nastupanja smrti bila pod dejstvom istog. Kada se evaluiraju rezultati i donose zaključci o ante mortem konzumaciji etanola, četiri osnovne stavke moraju biti nedvosmisleno definisane (133):

- mesto i način uzorkovanja krvi
- vreme proteklo od smrti do uzorkovanja, kao i stepen razvoja posmrtnih promena na telu
- uslovi pod kojima se uzorci čuvaju, korišćenje konzervansa, vreme proteklo od inicijalne analize
- metoda korišćena za analizu uzorka

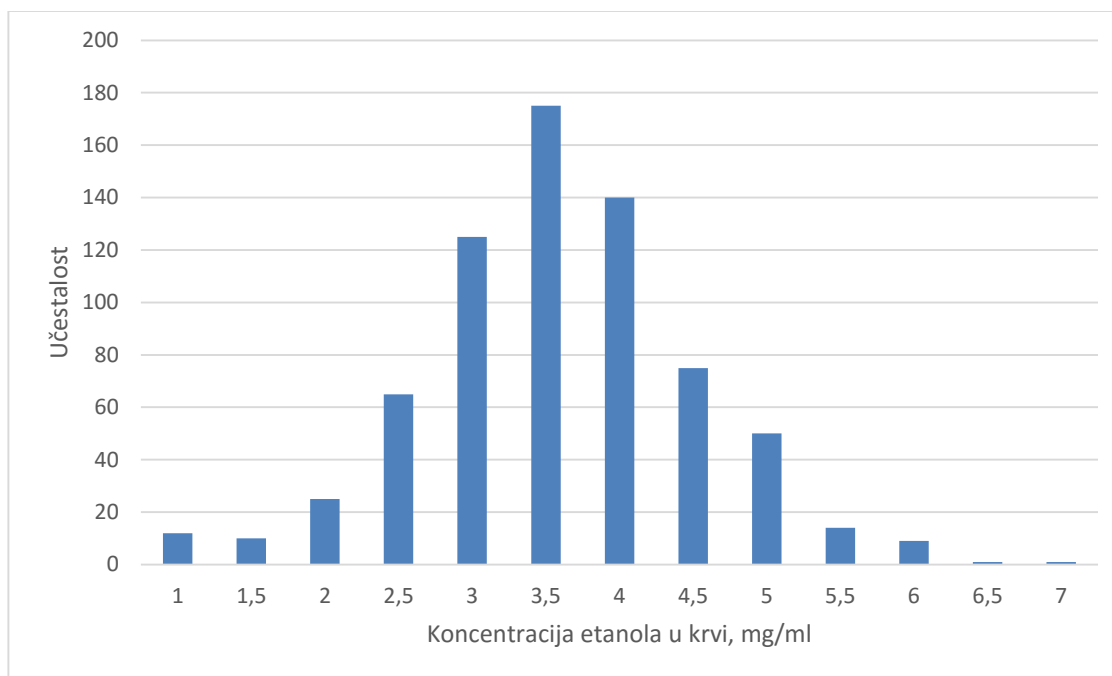
Osim navedenog poželjno je opisati izgled uzorka, eventualno postojanje ugrušaka, miris, fluidnost, i ukoliko se proceni kao neophodno, utvrditi sadržaj vode u uzorku.

Kod osoba koje su preminule u kliničkim uslovima, neophodno je poznavati tok lečenja i vrstu lekova koju je osoba primala. Administracija manitola npr. može u znatnom stepenu da olakša i pospeši postmortalnu sintezu etanola od strane bakterija (134). U nekim radovima opisani su slučajevi nenamerne kontaminacije aerosolima i rastvorima za čišćenje koji se koriste u autopsijskoj sali (135). Iako je poznato da bi trebalo izbegavati 70% etanol kao dezinficijens kože na mestu uzorkovanja, studije su pokazale zanemarljiv rizik od apsorpcije etanola preko intaktne kože (136), iako su u literaturi navedeni pojedinačni slučajevi kontaminacije krvi u femoralnoj veni dezinfikovanjem lacerirane i povređene kože pre operacije (137).

Preporučeno mesto uzimanja uzorka postmortalne krvi je svakako femoralna vena (130). Iako su male intra i interlaboratorijske varijacije u analiziranim uzorcima istog tkiva, koncentracije etanola u uzorcima različitih tkiva variraju u značajnom stepenu (138). Ovo se delimično može objasniti različitim sadržajem vode, ćelija i eventualnim prisustvom ugrušaka. Nažalost, u svakodnevnoj praksi često se sreću slučajevi gde je krv uzeta iz srčane šupljine, ili još gore, zahvaćena iz pleuralne duplje kao zamena za pravilno uzorkovanje (139). Ovakvo postupanje olakšava kontaminaciju uzoraka etanolom koji je difundovao nakon smrti iz želuca u okolna tkiva, ili koji je dospeo u plućno tkivo nakon agonalne aspiracije želudačnog sadržaja u kojem je bilo alkohola. Podrazumeva se da je kontaminacija neizbežna ukoliko postoje povrede želuca,

creva, pluća, jetre, tj. organa koji aktivno učestvuju u metabolizmu etanola. Krv iz femoralne vene je i u ovim slučajevima podoban uzorak jer je i fizički udaljena od povređenog tkiva, a takođe krv u femoralnoj veni je najmanje podložna lešnim promenama, i kao takva je uzorak izbora za postmortalnu toksikološku analizu etanola. Krv iz srčanih komora može da predstavlja adekvatnu zamenu ukoliko je volumen dostupne femoralne krvi isuviše mali.

Pitanje interpretacije dobijenih rezultata u odnosu na procenu zaživotnog stepena alkoholisanosti, ili donošenje zaključka o štetnom efektu visoke alkoholemije kao uzroka smrti je i dalje predmet mnogih istraživanja. BAC neophodan da izazove smrtni ishod u znatnom stepenu zavisi od životnog doba, navike i tolerancije na dejstvo etanola (140). Novije studije su pokazale da je srednja letalna koncentracija etanola u uzorcima femoralne krvi sa obdukcijom, u odsustvu drugih lekova ili opojnih supstanci, iznosila 3,60 mg/ml, sa SD od 0,86 mg/ml i rasponom od 0,74 mg/ml do 6,80 mg/ml, pri čemu 95% populacije ulazi u opseg od 2,2 mg/ml do 5 mg/ml (140, 141), što se može i shematski prikazati (grafikon 1). Osnovano je pretpostaviti da će BAC u postmortalnim uzorcima svakako biti niži od antemortem postignutog maksimuma, zbog metabolizma etanola od prestanka konzumacije do momenta smrti (142, 143, 144). Eliminacija, kako je navedeno, kod alkoholičara može biti i veća od 0,3 mg/ml (144).



Slika 6. Učestalost letalnih koncentracija etanola u krvi.

Kada se govori o alkoholu kao konkurišućem uzroku smrti, poznato je da akutna intoksikacija etanolom olakšava nastupanje hipotermije prilikom izloženosti niskim spoljašnjim temperaturama, kada smrt nastupa i pri BAC čije su vrednosti niže od letalnih (140). U alkoholisanom stanju sa poremećajem svesti (stupor, koma) moguće je nastupanje smrtnog ishoda usled akcidentalne traume, pozicione asfiksije ili asfiksije usled aspiracije povraćenog sadržaja, u čemu značajnu ulogu ima visoka koncentracija etanola (145). Sinergističko i/ili aditivno na toksične efekte etanola utiče i istovremeni unos lekova ili opojnih droga, poput opijata, antidepresiva, hipnotika, nekih antiepileptika i antipsihotika, itd. (141).

Kod postmortalne toksikološke analize, preporučuje se da BAC ispod 0,1 mg/ml ne bi trebalo beležiti kao pozitivan rezultat, jer je ovaj nivo svakako na nivou limita kvantitacije HS-GC metode, a time

se svakako izbegavaju nepotrebne spekulacije o ovako niskim BAC u zakonskom smislu (npr. kod profesionalnih vozača).

U slučajevima kada je smrt prouzrokovana povišenjem intrakranijalnog pritiska zbog epiduralnog ili subduralnog hematoma analiza koncentracije etanola u hematomu može biti korisnija od uzorka krvi iz femoralne vene ili srčanih šupljina. Posle ovakvih povreda žrtva često nadživljava nekoliko časova, tokom kog perioda se se alkohol iz periferne krvi eliminiše, a BAC smanjuje. Zbog redukovane cirkulacije u povređenim regionima mozga, zbog zgrušavanja i povreda krvnih sudova, etanol se u hematomu se ne metaboliše istim ritmom kao iz cirkulacije, i u ovakvim slučajevima može biti značajan pokazatelj BAC u vreme kada se dogodilo povređivanje. Ipak, potrebno je zadržati izvestan stepen opreza prilikom donošenja ovakvih zaključaka, jer nakon inicijalne traume povređene osobe mogu da nastave da konzumiraju alkoholna pića. Kod povreda praćenih ranama poglavine olakšan je prodor bakterija intrakranijalno, sa mogućnošću pojačane sinteze etanola u ugrušku nakon krvi (146, 147, 148).

Prethodno smo već komentarisali određivanje sadržaja vode u uzorku i razliku koja zbog toga postoji kod određivanja BAC u uzorku pune krvi i seruma/plazme kod živih osoba. Nakon smrti dolazi do postepenog gubitka vode iz organizma, a odnos voda/telesna masa nakon dužeg postmortalnog intervala iznosi oko 71,9% (od 65 do 85%), za razliku od oko 80% kod živih osoba (149). Mnogi autori, naročito u Nemačkoj, predlagali su korekciju preračunatog BAC na sadržaj vode od 80%, što bi korespondiralo prosečnom odnosu kod živih osoba, ali u praksi ovaj predlog nije našao primenu u drugim zemljama (150). Sam postupak određivanja sadržaja vode u krvi i tkivima je relativno jednostavan, i njegov značaj ostaje rezervisan za

slučajeve kada se BAC preračunava u odnosu na uzorke koaguluma ili solidnih tkiva (122).

1.10.2.2. Analiza urina

Pored krvi, urin je drugi najčešće korišćeni uzorak telesnih tečnosti koji se nakon obdukcije šalje na analizu etanola u toksikološku laboratoriju. Urin je neophodno uzeti sterilnom iglom kroz intaktan zid mokraćne bešike, a zatim se stavlja u plastične flašice sa fluoridnim konzervansom (cca 1-2%), nakon čega se transportuje u laboratoriju na analizu ili se do momenta analize čuva u frižideru, na 4°C (151).

Kvantitativni odnos između koncentracije etanola u urinu (UAC) i krvi (BAC) proučavan je dugo (152). Neke osnovne razlike ogledaju se pre svega u različitom sadržaju vode (u urinu prosečno 99-99,9%, a u punoj krvi 80%). Takođe, postoji vremenski pomak krive UAC u odnosu na BAC, tj. pik koncentracije u mokraći javlja se kasnije u odnosu na krv, te je i tokom faze eliminacije koncentracija u mokraći veća nego u krvi (153). Preračunom UAC/BAC odnosa na osnovu dobijenih rezultata analiza mogu se izvući korisni zaključci o fazi alkoholisanosti u kojoj se osoba nalazila u vreme smrti. Naime, ukoliko su vrednosti približno iste ili manje od 1,25, one upućuju na nekompletnu resorpciju u vreme smrti i na skorašnje konzumiranje alkohola. Ukoliko je ovaj odnos veći od 1.25, ovakav nalaz upućuje na završenu fazu resorpcije i dominantnu eliminaciju etanola iz organizma (154). Ako nalaz nije ubedljiv, a postavlja se pitanje vremena pijenja, neophodno je tokom obdukcije uzeti i uzorak želudačnog sadržaja za analizu koncentracije etanola (155).

Značaj urina kao uzorka za analizu koncentracije etanola ogleda se i u tome što ga u najvećoj meri čini voda, i što je unutar mokraćne bešike izolovan od krvotoka i drugih organa, te je mogućnost postmortalne kontaminacije mikroorganizmima manja u odnosu na krv. Takođe, urin zdravih osoba ili ne sadrži ili sadrži glukozu u tragovima, te je znatno smanjena šansa za postmortalnu produkcije etanola. Nažalost, ovo je i značajan limitirajući faktor ove analize kod osoba obolelih od dijabetesa ili glikozurije (156). Glukoza je najvažniji supstrat za postmortalnu produkciju etanola od strane bakterija i gljivica, te npr. nalaz povišenog UAC u odsustvu povećane BAC kod dijabetičara ukazuje na produkciju etanola u mokraći nakon smrti, npr. gljivičnom fermentacijom glukoze (157). Podaci o prethodnim bolestima (npr. diabetes mellitus) pokojne osobe stoga ima veliki značaj u interpretaciji analize etanola u postmortalnim uzorcima. U odsustvu ovih podataka, osim analize urina značajnu pomoć može da pruži i određivanje glukoze u staklastom telu (158).

Ukoliko postoji duži protok vremena između prestanka pijenja i smrti moguće je da BAC u autopsijskom uzorku krvi bude praktično nula, dok se u urinu još uvek nalazi povišena koncentracija etanola, zahvaljujući zaživotnom metabolizmu i eliminaciji iz krvi putem jetre. Što je veća zapremina urina u mokraćnoj bešici, to je najčešće i veći odnos UAC/BAC. Naime, u mokraćnoj bešici, sa izuzetkom prethodno navedenih slučajeva, ne postoji metabolizam etanola, a retrogradna difuzija u okolna tkiva je praktično zanemarljiv proces (159).

Bez obzira na sve navedeno, kao i na visok stepen korelacije između UAC i BAC, koncentracija etanola u krvi ne bi trebala da se preračunava ili analizira isključivo na osnovu nalaza UAC. Pojedinačna odstupanja od srednjih vrednosti su velika, sa visokom standardnom devijacijom, što za posledicu ima nesiguran opseg predviđene

koncentracije etanola u krvi (160). U anglosaksonskom pravu ovo ima poseban značaj u zavisnosti od toga da li se radi o krivičnom ili građanskopravnom postupku, gde se koriste različiti nivoi sigurnosti dokaza.

1.10.2.3. Analiza staklastog tela

Prva publikacija o ulozi staklastog tela u određivanju alkoholemije datira još iz 60-tih godina prošlog veka (161), od kada je u stručnoj literaturi objavljen veliki broj publikacija na ovu temu (162,163,164). Analiza staklastog tela nije od značaja samo za utvrđivanje koncentracije etanola, već i drugih hemijskih jedinjenja u organizmu, npr. laktata i glukoze kao indikatora hiperglikemije pre smrti (165). Istraživanja su pokazala da kako kod analize etnola, tako i drugih hemijskih supstanci, ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama između uzoraka uzetih iz levog i desnog oka (166).

Najveća prednost staklastog tela kao uzorka za analizu hemijskih jedinjenja u organizmu je udaljenost od digestivnog trakta i velikih krvnih sudova, a samim tim i mala izloženost potencijalnoj bakterijskoj kontaminaciji, što ima poseban značaj u slučajevima politraume ili kada je leš izmenjen truležnim promenama (167). Ovo čini da je staklasto telo posebno podoban uzorak za analizu etanola u gore navedenim slučajevima, naročito kada postoji truležna izmenjenost tela zbog dodatne mogućnosti postmortalne sinteze etanola, iako se mora imati u vidu činjenica da samo staklasto telo sadrži glukozu, koja je upravo osnovni supstrat za postmortem sintezu alkohola (168). Prosečan odnos etanola u staklastom telu i krvi je direktno proporcionalna međusobnom odnosu vode između ova dva tkiva, i iznosi oko 1.15-1.20:1, međutim individualne varijacije su

velike, i koncentracija etanola u krvi ne bi trebala da se procenjuje na osnovu ovog odnosa. Na osnovu najmanje tri velike studije u Nemačkoj i SAD, rađene na više od 500 uzoraka, utvrđeno je da postoji visok stepen korelacije između koncentracije etanola u krvi i u staklastom telu (r od 0,936 do 0,979), a u jednom od tri navedena istraživanja predložen je odnos koncentracije $VH \times 0,81 = BAC$, pri čemu je VH koncentracija etanola u staklastom telu (eng. *Vitreous Humour*) (169, 170).

Vreme potrebno da molekuli etanola prodru u staklasto telo iz krvotoka je vrlo kratko, te se vrh koncentracije u krvi i u staklastom telu postižu praktično u isto vreme (171), nakon čega etanol podleže eliminaciji, po istoj dinamici i mehanizmu kao i iz krvi.

Posebno značajno za forenzičke analize je činjenica da je etanol u staklastom telu vrlo stabilan u dužem periodu čuvanja uzoraka, na niskoj temperaturi (najmanje 4°C), uz upotrebu fluorida kao prezervansa. Prilikom ispitivanja, tokom čuvanja uzoraka krvi u trajanju od 12 meseci, pad koncentracije etanola u uzorcima femoralne krvi iznosio je u proseku 8% ($p < 0,001$), dok ovakva promena nije uočena u uzorcima staklastog tela (172, 173).

Korišćenje staklastog tela za toksikološke analize se ne preporučuje u slučajevima izražene dehidracije, kod uznapredovale dekompozicije leša, ukoliko su kod preminule osobe za života dijagnostikovana oftalmološka oboljenja, ili je vršena hirurška intervencija na oku (174).

1.10.2.4. Nekonvencionalni uzorci

Kao što je već rečeno, preporučeni biološki uzorci za analizu alkoholemije kod preminulih osoba jesu krv iz femoralne vene, urin i

staklasto telo. Međutim, u slučajevima kada je ovakvo uzorkovanje nemoguće, za potrebe hemijskotoksikoloških analiza preporučuje se uzimanje cerebrospinalne i sinovijalne tečnosti, žuči, isečaka mozga, poprečnoprugastih mišića, jetre, slezine ili koštane srži (175-178).

U pojedinim istraživanjima korišćeni su i drugi uzorci, kao što su tkivo testisa, tečnosti iz truležnih mehurova, sadržaj paranazalnih sinusa u slučajevima utopljenja, ili čak perilimfna tečnost unutrašnjeg uva (179, 180).

Prilikom interpretacije rezultata iz ovakvih uzoraka neophodno je imati na umu različit sadržaj vode, glukoze i glikogena u ovim tkivima, kao i moguću ćelijsku vanćelijsku enzimsku aktivnost, što svakako utiče ne samo na inicijalne rezultate, već i na stabilnost etanola u tkivima nakon uzorkovanja (181). Npr., organi poput jetre ili bubrega i nakon smrti u kraćem vremenskom periodu zadržavaju enzimsku aktivnost, te je odnos etanola u jetri i krvi npr. 0,56, iako je odnos vode u ovim tkivima približno 1:1 (182).

Kod izrazito truležno izmenjenih leševa, verovatno najbolji tkivni uzorak za analizu etanola, ali i drugih hemijskih supstanci u organizmu, je skeletni mišić, i to četvoroglavi mišić butine, čiji je uzorak mase oko 1g potrebno iseći na manje delove, macerirati ili homogenizovati i izmešati sa dejonizovanom vodom pre same analize metodom gasne hromatografije (125, 183).

1.10.3. Efekti dekompozicije i kontaminacije uzoraka mikroorganizmima

Mogućnost stvaranja i/ili razgradnje etanola u telu ali i u tkivnim uzorcima sa lešnog materijala, oduvek je predstavljalo problem u interpretaciji alkoholemije (125, 184-186). Osnovni

supstrat za proizvodnju etanola u telu nakon smrti predstavlja glukoza, čiji se porast koncentracije u krvi i tkivima dešava nakon smrti, upravo zahvaljujući aktivnosti mikroorganizama. Zbog toga je u forenzičkim analizama preporučljivo uzorcima dodavati konzervans u vidu natrijum fluorida (rastvor 1-2%), čime se sprečava dalja enzimska produkcija etanola. Fluoridni jon inhibiše više različitih enzima u glikolitičkom putu (npr. enolaze), a negativno deluje i na aktivnost gljivica i plesni, odgovornih za fermentaciju glukoze i stvaranje etanola (125, 187). Zbog postmortalne sinteze moguć je porast koncentracije etanola u uzorcima i do 0,3 mg/ml (125), a u zavisnosti od vrste, anatomske lokalizacije uzorkovanog tkiva, moguće blizine digestivnog trakta, sadržaja glukoze, uzroka smrti (npr. politrauma), (ne)korišćenja konzervansa, itd. (188).

Bakterijski kontaminanti mogu biti, osim stvaranja etanola, odgovorni i za smanjivanje njegove koncentracije u tkivnim uzorcima, naročito onim uzetim sa lešnog materijala (167, 189). Osim moguće kontaminacije, na gubitak etanola iz uzoraka utiče vreme prezervacije, temperatura na kojoj se čuvaju uzorci, isparljivost etanola prilikom otvaranja uzorkovanog tkiva kao i enzimska i neenzimska oksidacija etanola putem oksihemoglobina iz eritrocita (190).

Upravo iz prethodno navedenih razloga, u toksikološkoj sudskomedicinskoj praksi postoji potreba za razlikovanjem porekla povišene koncentracije etanola u uzorcima, tj. da li je nalaz posledica antemortem konzumiranja alkoholnih pića, ili se može pripisati postmortalnoj produkciji alkohola, naročito kada su u pitanju uzorci sa truležno izmenjenih leševa (191). U tom cilju pokušano je da se utvrdi koji bi biohemijski indikatori ukazivali na konzumaciju etanola pre smrti. Jedna od najčešće pominjanih supstanci jeste etil-

glukuronid, čiji nalaz podrazumeva da je metabolisanje etanola postojalo tokom života, ali ne i nakon smrti (192). Sam nalaz etil-glukuronida nije dokaz povišene koncentracije etanola, s obzirom na to da je poluvreme eliminacije ovog jedinjenja mnogo duže nego kod etanola (193).

Osim etil-glukuronida, kao markeri zaživotne konzumacije alkohola korišćeni su neoksidativni metaboliti etanola (fosfatidiletanol, estri etanola i masnih kiselina kratkih lanaca) i metaboliti serotonina (5-hidroksitriptofol i 5-hidroksiindolacetat) ali u stručnoj literaturi ne postoji dovoljno podataka o senzitivnosti i specifičnosti ovih supstanci, pre svega u poređenju sa etil-glukuronidom (194).

1.10.4. Problem posmrtno difuzije alkohola

Pasivna difuzija etanola i lekova kroz zid želuca dovodi do povećanja njihove koncentracije u okolnim tkivima ali i u centralnoj i perifernoj krvi, što predstavlja veliki toksikološki problem prilikom analize posmortalnih tkivnih uzoraka. (195). Brzina i stepen difuzije zavise od koncentracijskog gradijenta, ali i od intaktnosti mukoznih membrana. Stoga, ukoliko je osoba u momentu smrti imala veću količinu alkohola u želucu, i/ili je u sklopu politraume došlo do rascepa želuca, jetre, creva i sl. drastično je povećana mogućnost pasivne difuzije etanola u okolna tkiva, u centralni krvotok, srce, pleuru, perikard itd. Značaj i obim ovakvog fenomena zavisi pre svega od vremena pijenja poslednjeg alkoholnog pića pre smeti, njegove količine i koncentracije, kao i od prisustva hrane u želucu, jer je etanol u želucu razblažen prisutnom hranom.

Ukoliko okolnosti slučaja upućuju na konzumiranje veće količine alkoholnog pića pre smrti preporučuje se analiza želudačnog sadržaja,

što inače nije deo standardne procedure. Nalaz koncentracije etanola u želucu iznad 5 mg/kg smatra se potvrdnim za skorašnju konzumaciju etanola (196, 197). Postoji mogućnost kontaminacije etanolom respiratornog trakta i krvi iz srčane kese i ukoliko je agonalno aspiriran povraćen sadržaj bogat etanolom (198), što mora biti histološki verifikovano.

Zbog mogućnosti kontaminacije respiratornog trakta želudačnim sadržajem bogatim alkoholom, mora se uvek obratiti pažnja prilikom promene položaja leša, eventualno primenjene mere kardiopulmonalne reanimacije, intravensku administraciju lekova i sl., što sve može da olakša redistribuciju alkohola koji je dospao u respiratorni trakt.

1.11. Zakonska regulativa u Republici Srbiji

Kada je u pitanju alkoholisanost, stepen alkoholemije i njeno utvrđivanje, u Srbiji iste reguliše pre svega Zakon o bezbednosti saobraćaja na putevima (88-93) i pripadajući podzakonski akti – uredbе, pravilnici itd., što je u skladu i sa zakonodavstvom drugih zemalja. Pitanje alkoholisanosti u saobraćaju je od izuzetnog značaja za svaku državu, imajući u vidu činjenicu da je kod više od 50% učesnika u saobraćajnim nezgodama konstatovano prisustvo etanola u organizmu.

Član 46 Pravilnika o načinu vršenja kontrole i neposrednog regulisanja saobraćaja na putevima i vođenju obaveznih evidencija o primeni posebnih mera i ovlašćenja (199-203) bliže reguliše utvrđivanje prisustva alkohola i/ili drugih psihoaktivnih supstanci kod učesnika u saobraćaju.

Pravilnik navodi da policijski službenik podvrgava učesnike u saobraćaju testiranju zbog opravdane sumnje da u organizmu ima

alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci. Pravilnik nažalost, kao ni Zakon ne definiše šta podrazumeva termin „opravdana sumnja“. Učesnik se ispitivanju podvrgava pomoću odgovarajućih sredstava (alkometar, droga test i dr.).

Nakon obavljenog ili odbijenog ispitivanja policijski službenik popunjava propisani zapisnik, koji potpisuju kontrolisano lice i policijski službenik koji je obavio ispitivanje.

Zapisnik iz prethodnog stava sadrži niz administrativnih podataka, ali ono što je u forenzičkoj praksi od ključne važnosti jeste insistiranje da se navede tačno vreme učinjenog prekršaja i samog testiranja.

Ako je kontrolisano lice u takvom stanju da propisani zapisnik ne može potpisati ili odbije da potpiše, policijski službenik će i to konstatovati u zapisniku.

Ukoliko učesnika u saobraćaju iz očigledno opravdanih razloga nije moguće podvrgnuti ispitivanju odgovarajućim sredstvima, policijski službenik će ga dovesti u zdravstvenu ustanovu radi podvrgavanja stručnom pregledu. Kao i prethodno, Pravilnik ne definiše precizno o kakvim opravdanim razlozima se radi u ovom slučaju.

Ukoliko učesnik u saobraćaju osporava količinu alkohola izmerenu odgovarajućim sredstvima policijski službenik će mu omogućiti da na licu mesta podnese pismeni zahtev u propisani zapisnik u kome su utvrđeni rezultati ispitivanja, da o sopstvenom trošku bude podvrgnut analizi krvi, urina ili drugih telesnih materija.

Pravilnik jasno definiše da se uzimanje uzoraka za analizu vrši isključivo u zdravstvenoj ustanovi, iako se ne precizira tačna vrsta ustanove (Dom zdravlja, Služba HMP; Bolnica, Klinički centar, itd ...). Dovođenje kontrolisanog lica u zdravstvenu ustanovu vrši policijski službenik sa propisanim nalogom za odgovarajuće ispitivanje.

Sprovođenju stručnog pregleda iz stava 5. ovog člana, odnosno prilikom uzimanja krvi, krvi i urina ili drugih telesnih materija, po pravilu, prisustvuje policijski službenik.

Član 187. Zakona o bezbednosti u saobraćaju na putevima definiše psihofizičke uslove za bezbedno upravljanje vozilom (88-93)

Zakon definiše da vozač ne sme da upravlja vozilom u saobraćaju na putu niti da počne da upravlja vozilom ako je pod dejstvom alkohola i /ili psihoaktivnih supstanci.

Pod dejstvom alkohola je vozač, odnosno lice za koje se analizom odgovarajućeg uzorka krvi utvrdi sadržaj alkohola veći od 0,30 mg/ml ili ako je prisustvo alkohola u organizmu utvrđeno odgovarajućim sredstvima ili aparatima za merenje alkoholisanosti (alkometrom i dr.), što odgovara sadržini alkohola u krvi većoj od 0,30 mg/ml. Već je ranije napomenuto da je ovaj limit različit u drugim državama, u rasponu od 0 do 0,8 mg/ml, ali praktično zakonodavstva svih zemalja jasno prepoznaju štetne efekte alkohola u saobraćaju te postavljaju zakonske limite dozvoljenih koncentracija u organizmu za vozače amatere.

Zakon takođe definiše kategorije tzv. profesionalnih vozača kod kojih nije dozvoljeno ni najmanje prisustvo etanola u organizmu. Ovakva zakonska regulativa ponekad može da dovede do nedoumica u tumačenju rezultata, s obzirom na to da uvek treba imati u vidu

koncentraciju endogeno produkovanog etanola, kao i samu grešku metode.

Zbog procene efekta alkoholemije na psihomotorne funkcije učesnika u saobraćaju, kao i kasnijeg forenzičko psihijatrijskog tumečenja sposobnosti upravljanja motornim vozilom, ZOBS je definisao sledeće pravne kategorije alkoholisanosti vozača, instruktora vožnje i kandidata:

- 1) do 0,30 mg/ml - blaga alkoholisanost,
- 2) od 0,30 mg/ml do 0,50 mg/ml - umerena alkoholisanost,
- 3) od 0,50 mg/ml do 1,20 mg/ml - srednja alkoholisanost,
- 4) od 1,20 mg/ml do 1,60 mg/ml - teška alkoholisanost,
- 5) od 1,60 mg/ml do 2,00 mg/ml - veoma teška alkoholisanost,
- 6) od 2,00 mg/ml - potpuna alkoholisanost

Posebno napominjemo da se radi o pravnim a ne medicinskim normativima, koji svoje uporište i razloge imaju u zakonskoj regulativi.

Na osnovu člana 280 ZOBS Republike Srbije (88-93), Ministarstvo zdravlja je 2011. donelo Pravilnik o uslovima koje moraju ispunjavati zdravstvene ustanove koje vrše analizu krvi, urina i/ili drugih telesnih materija u cilju utvrđivanja sadržaja alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci u organizmu koje su zabranjene za upotrebu pre i za vreme vožnje (204).

Ovim pravilnikom propisuju se uslovi koje u pogledu stručnih kadrova, opreme i drugih uslova moraju ispunjavati navedene zdravstvene ustanove, a shodno pravilima struke.

Prema Pravilniku, analize etanola ili drugih psihoaktivnih supstanci može da vrši zdravstvena ustanova koja ispunjava sledeće uslove u pogledu kadra i opreme:

1. Ima najmanje jednog specijalistu toksikološke hemije ili medicinske biohemije ili kliničke biohemije
2. Ima obezbeđenu sledeću opremu:
 - biohemijski analizator
 - gasni hromatograf
 - tečni hromatograf sa detekcijom na masenom spektrometru
 - drugu neophodnu laboratorijsku opremu i potrošni materijal za obavljanje analize

Zdravstvena ustanova mora da poseduje standardizovanu metodologiju i kontrolisanu opremu za kvantitativno određivanje sadržaja alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci u organizmu, i mora da poseduje ovlašćenje za obavljanje navedenih poslova od Ministarstva zdravlja.

Analiza uzoraka krvi, urina i drugih telesnih materija radi utvrđivanja sadržaja alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci može se obavljati standardizovanim enzimskom metodom, metodom gasne hromatografije ili drugom naučno priznatom metodom.

Superanaliza dobijenog rezultata može se vršiti samo u referentnoj laboratoriji, ponovljenom analizom uzorka.

Uzimanje krvi, urina i/ili drugih telesnih materija obavlja se u zdravstvenoj ustanovi pod kontrolom zdravstvenog radnika.

Uzimanje krvi i/ili drugih telesnih materija za analizu na sadržaj alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci, klinički pregled i ispunjavanje obrasca vrši lekar.

Uzimanje telesnih materija za analizu može vršiti i medicinska sestra - tehničar pod nadzorom lekara.

Uzorak krvi za analizu, u količini od 20 ml, uzima se venepunkcijom uz uslov da se mesto uboda ne čisti etanolom ili drugim alkoholima, već isključivo bezalkoholnim dezinfekcionim sredstvima ili fiziološkim rastvorom.

Krv se uzima u dva vakutajnera, zapremine po 10 ml, sa heparinom. Uzorci se čuvaju na + 4°C. Jedan uzorak uzima se u rad u naredna 24 časa. Drugi uzorak čuva se zamrznut u narednih šest meseci, a najduže godinu dana.

Za analizu utvrđivanja prisustva sadržaja psihoaktivnih supstanci u urinu i/ili drugim telesnim materijama, uzorak urina (u količini od najmanje 40 ml) i/ili druge telesne materije uzima se u hemijski čistu i sterilnu posudu koja je hermetički zatvorena. Uzimaju se dva uzorka, po 20 ml, od kojih se jedan daje na analizu u naredna 24 časa, a drugi se zamrznut čuva u narednih šest meseci.

2. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu podataka iz literature i vladajućih stručnih stavova, postavljene su sledeće radne hipoteze:

- očekuje se da će u vremenskom periodu od šest meseci doći do statistički značajne promene koncentracije etanola u uzorcima bioloških tkiva.
- očekuje se da će postojati statistički značajna razlika u rezultatima koncentracije etanola kod uzoraka krvi uzetih od živih osoba koji su u periodu od 6 meseci bili otvarani radi ponovne analize, i onih uzoraka koji su u istom periodu ostali zatvoreni
- očekuje se postojanje značajne razlike u koncentraciji etanola prilikom ponovljenih analiza, između uzoraka živih osoba i kadaveričnog materijala.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi ovog rada su da se uz pomoć HS-GC metode ustanovi:

1) da li postoji statistički značajna promena koncentracije etanola u periodu od šest meseci u uzorcima krvi dobijenih od živih osoba i u uzorcima krvi sa autopsijskog materijala.

2) da li postoji značajna razlika u promeni koncentracije etanola između uzoraka krvi, urina i staklastog tela sa autopsijskog materijala, koji se čuvaju zamrznuti u vremenskom periodu od šest meseci.

3) da li postoji statistički značajna razlika u promeni koncentracije etanola u uzorcima krvi uzetih od živih osoba koji su sve vreme bili zatvoreni, i onih koji su u periodu od 6 meseci bili otvarani radi ponovne analize.

4) da li postoji statistički značajna razlika u promeni koncentracije etanola u uzorcima krvi, mokraće i staklastog tela uzetih sa autopsijskog materijala koji su u periodu od 6 meseci ostali zatvoreni, i onih koji su bili otvarani radi ponovne analize.

5) da se utvrdi u kom tipu uzorka uzetog sa lešnog materijala postoji najmanja promena koncentracije tokom perioda čuvanja uzorka.

4. MATERIJAL I METODE

Etanol je u uzorcima krvi živih osoba, kao i u uzorcima krvi, mokraćne i staklastog tela sa autopsijskog materijala određivan HS GC metodom, pri čemu su uzorci pripremani na sledeći način:

- uzorci krvi živih osoba uzeti su venepunkcijom u zdravstvenoj ustanovi, prema Pravilniku, i dostavljeni u epruvetama sa antikoagulansom heparinom. Iz epruveta je pipetirano 0,1 ml krvi u vijale, staklene flašice od 20ml sa aluminijumskom kapom i silikonskom septom, uz dodavanje kuhinjske soli (NaCl) i rastvora internog standarda, 0,2% propanola. Analiza dobijenih uzoraka vršena je dva puta, radi utvrđivanja nepreciznosti same metode. Ostatak krvi podeljen je u dve staklene epruvete sa antikoagulansom, uz procenat vazduha od 20% (CA%), koje su zatvarane gumenim čepom. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su u zamrzivaču na -18 °C. Postupak analize uzorka krvi iz jedne epruvete ponavljan je nakon 2 i 4 meseca, dok je nakon 6 meseci vršena analiza oba sačuvana uzorka.

- uzorci krvi sa lešnog materijala dobijeni su venepunkcijom sterilnom iglom i špricom iz femoralne vene, u količini od 10ml. Nakon toga uzorak krvi stavljan je u epruvete sa antikoagulansom, i prebačen u toksikološku laboratoriju, gde se analiza vršila istog dana ili narednog, u kom slučaju se uzorak čuvao u frižideru na +4°C.

- uzorci mokraćne sa lešnog materijala dobijeni su punkcijom zida mokraćne bešike sterilnom iglom i špricom, u količini od 10ml. Nakon toga uzorak mokraćne stavljan je u plastične bočice sa poklopcem, prebačen u toksikološku laboratoriju Centra za sudsku medicinu, gde

se analiza vršila istog dana ili narednog, u kom slučaju se uzorak čuvao frižideru na +4°C.

- uzorci staklastog tela sa lešnog materijala dobijeni su punkcijom zida očne jabučice, u predelu spoljašnjeg ugla očnog kapka, sterilnom iglom tankog prečnika. Uzorci staklastog tela stavljeni su u po dve plastične Eppendorf kivete od po 5 ml, nakon toga prebačene u toksikološku laboratoriju, gde se analiza vršila istog ili sledećeg dana, uz obavezno čuvanje uzorka do analize na +4°C.

Dalji tok postupanja sa autopsijskim materijalom bio je identičan kao i kod analize uzoraka krvi živih osoba. Uzorci su uzimani u staklene viala, i uz obavezno dodavanje internog standarda u formi n-propanola, analizirana je koncentracije etanola HS GC metodom. Nakon toga ostatak biološkog materijala podeljen je u dve staklene epruvete (sa antikoagulansom kada je u pitanju uzorak krvi) uz procenat vazduha od 20%, koje su zatvarane gumenim čepom. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su u zamrzivaču na -18 °C. Postupak analize uzoraka iz jedne epruvete ponavljan je nakon 2 i 4 meseca, dok je nakon 6 meseci vršena analiza oba sačuvana uzorka.

Sama hedspejs analiza vršena je stavljanjem viala u HS sempler (eng. *headspace sampler*) Agilent G1888 (Slika 5.), uz podešavanje parametara na sledeći način:

- vreme izjednačenja temperature 5 min,
- vreme postizanja pritiska nosećeg gasa 0,8 min
- vreme punjenja petlje 0,5 min
- vreme izjednačenja temperature petlje 0,05 min
- vreme injektiranja 1 min
- temperatura grejača 100 °C

- temperatura petlje 110 °C
- temperatura transfer linije 115 °C
- pritisak gasa nosača 16,7 psi (eng. *pounds per square inch*)
- pritisak u vialu 16 psi



Slika 7. Hedspejs sempler Agilent G1888

U vialima stvorena parna faza automatski se injektuje u gasni hromatograf sa plameno-jonizujućom detekcijom GC Agilent 6850 (slika 6), uz podešavanje parametara na sledeći način:

- plameno-jonizacioni (FID) detektor na 300 °C
- split-splitless injektor na 250 °C
- protok gasa u inletu 17 ml/min
- protok gasa u koloni 5 ml/min
- protok gasa H₂ u detektoru 40 ml/min
- pritisak u inletu 15,08 psi
- protok vazduha 35 ml/min
- grejač 40 °C

- vreme trajanja analize (eng. *runtime*) u GC nakon injektiranja 1,5 min, gas N₂ u modu split



Slika 8. Gasni hromatograf sa plameno-jonizacionom detekcijom GC Agilent 6850

Karakteristike DB-ALC1 kolone u kojoj je vršena separacija i analiza uzoraka bile su:

- dužina 30m
- unutrašnji prečnik (ID) 0,53 mm
- debljina filma 3 μ m
- temperaturni opseg 20 – 280 °C

Obrada podataka i kontrola aparata vršeni su kroz programski paket GC/MSD ChemStation softver za operativni sistem MS Windows XP.

4.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka

Istraživanje je otvoreno, randomizirano i prospektivnog tipa.

Uzorci krvi živih osoba dobijeni od MUP-a RS odgovaraju metodi slučajnog izbora. Uzorci su dobijeni od osoba oba pola, pri čemu je metodom slučajnog izbora odabrano 100 uzoraka čija je pojedinačna vrednost alkoholemije bila u rasponu od 0,1 mg/ml do 5 mg/ml. Nakon inicijalne dvostruke analize, kao što je prethodno navedeni, jedan uzorak od iste osobe je čuvan u trajanju od 180 dana, dok je drugi otvaran i analiziran nakon 60, 120 i 180 dana. Ukupan broj analiza alkoholemije u krvi živih osoba iznosio je 500.

Uzorci krvi, mokraće i staklastog tela sa uzeti su sa 60 leševa, oba pola, nezavisno od starosti, metodom slučajnog izbora, pri čemu je vrednost alkoholemije prilikom inicijalne analize iznosila između 0,1 i 5 mg/ml. Nakon inicijalne dvostruke analize, kao što je prethodno navedeno, po jedan uzorak krvi, urina i staklastog tela od iste osobe je čuvan u trajanju od 180 dana, dok je drugi otvaran i analiziran nakon 60, 120 i 180 dana. Ukupan broj analiza koncentracije etanola u krvi, mokraći i staklastom telu sa leševa iznosio je 360.

Iz istraživanja su bili isključeni leševi kod kojih su nastupile truležne promene, ili kod kojih je utvrđeno povređivanje srca, pluća, digestivnog trakta i želuca, kao i kod slučajeva nasilne mehaničke asfiksije zbog aspiracije povraćenog želudačnog sadržaja. Takođe iz istraživanja su isključeni uzorci politraumatizovanih živih osoba, kao i

onih koji su određeno vreme proveli u jedinicama intenzivne nege i/ili na detoksikacionoj terapiji.

Svi uzorci poreklom od živih osoba podeljeni su prema inicijalnoj vrednosti alkoholemije na sledeće grupe:

- do 0,49 mg/ml
- od 0,5 do 0,99 mg/ml
- od 1 do 1,49 mg/ml
- od 1,5 do 1,99 mg/ml
- od 2 do 2,49 mg/ml
- preko 2,5 mg/ml

Zbog manjeg broja uzoraka i malih podgrupa ovakva podela nije vršena kod lešnih uzoraka.

U ovoj studiji dobijeni rezultati su obrađeni uz pomoć standardnih statističkih metoda (\bar{x} , SD, SE, Var, T test) korišćenjem programa MS Excell 2013 iz programa MS Office 2013. Kao statistička značajnost uzimana je vrednost $p < 0,05$.

5. REZULTATI

Dobijeni rezultati su, radi preglednosti, prikazani tabelarno i grafički. Za svaku grupu rezultata tabelarno su prikazani izračunati deskriptivni statistički parametri (\bar{x} – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, SE – standardna greška, Var – varijansa uzorka, minimalna i maksimalna vrednost). Vrednosti u tabelama poređane su u rastućem nizu.

Nakon analize deskriptivnih statističkih parametara, izvršeno je statističko testiranje varijanse (F), nakon čega je uz pomoć t-testa određeno da li postoji statistički značajna razlika između dobijenih vrednosti, na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$.

Radi preglednosti tabela uzorkovane vrednosti označene su na sledeći način:

- C_1 – inicijalna analiza
- C_2 – analiza nakon dva meseca
- C_4 – analiza nakon četiri meseca
- C_6 – analiza nakon šest meseci
- ΔC – razlika u koncentracijama između C_1 i C_6

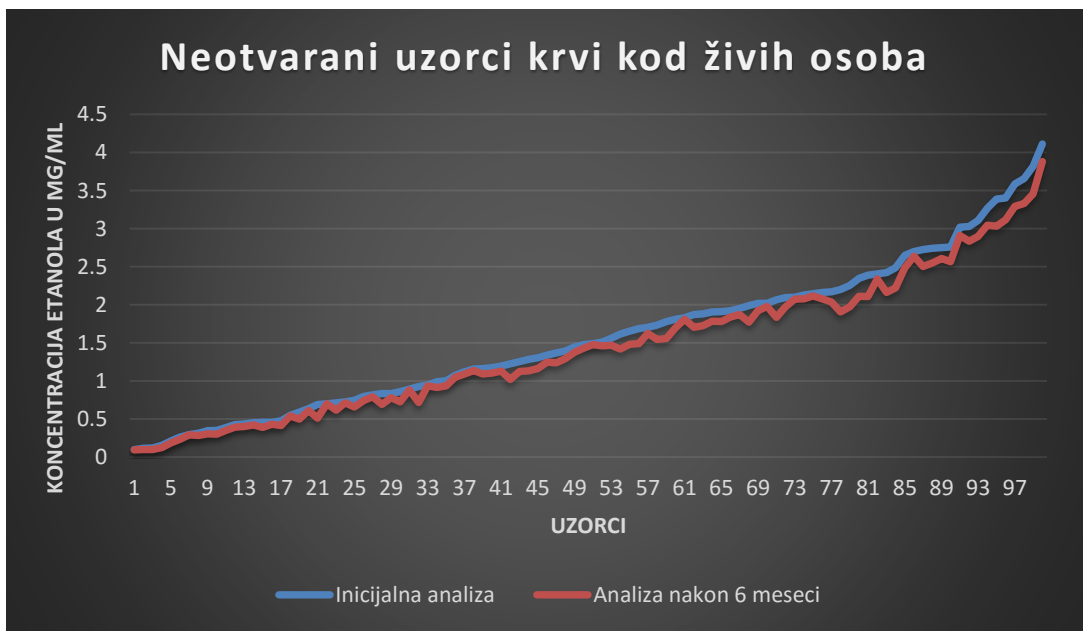
ANALIZE KRVI ŽIVIH OSOBA

Tabela 4. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba (mg/ml)

C_1	C_6	ΔC
0.101	0.095	0.006
0.116	0.102	0.014
0.121	0.1	0.021
0.153	0.125	0.028
0.215	0.187	0.028
0.264	0.235	0.029
0.297	0.292	0.005
0.314	0.285	0.029
0.349	0.305	0.044
0.354	0.301	0.053
0.389	0.351	0.038
0.427	0.392	0.035
0.434	0.402	0.032
0.452	0.424	0.028
0.455	0.39	0.065
0.458	0.432	0.026
0.476	0.415	0.061
0.55	0.542	0.008
0.59	0.497	0.093
0.638	0.613	0.025
0.693	0.512	0.181
0.702	0.7	0.002
0.713	0.615	0.098
0.724	0.712	0.012
0.745	0.658	0.087
0.799	0.743	0.056
0.819	0.792	0.027
0.834	0.693	0.141
0.837	0.782	0.055
0.862	0.724	0.138
0.894	0.88	0.014
0.927	0.716	0.211
0.95	0.937	0.013
0.99	0.917	0.073
1.005	0.936	0.069
1.075	1.05	0.025
1.121	1.09	0.031

1.157	1.139	0.018
1.165	1.093	0.072
1.174	1.105	0.069
1.198	1.129	0.069
1.228	1.02	0.208
1.257	1.124	0.133
1.283	1.133	0.15
1.306	1.162	0.144
1.339	1.246	0.093
1.37	1.239	0.131
1.396	1.295	0.101
1.45	1.377	0.073
1.479	1.431	0.048
1.491	1.477	0.014
1.512	1.461	0.051
1.561	1.471	0.09
1.618	1.418	0.2
1.655	1.484	0.171
1.687	1.49	0.197
1.704	1.625	0.079
1.734	1.546	0.188
1.779	1.56	0.219
1.809	1.696	0.113
1.83	1.812	0.018
1.874	1.704	0.17
1.881	1.724	0.157
1.907	1.785	0.122
1.912	1.781	0.131
1.923	1.839	0.084
1.954	1.872	0.082
1.992	1.773	0.219
2.019	1.922	0.097
2.022	1.977	0.045
2.067	1.837	0.23
2.095	1.973	0.122
2.1	2.073	0.027
2.129	2.079	0.05
2.146	2.117	0.029
2.162	2.08	0.082
2.171	2.039	0.132
2.2	1.905	0.295

2.256	1.975	0.281
2.347	2.111	0.236
2.392	2.107	0.285
2.407	2.34	0.067
2.425	2.161	0.264
2.488	2.221	0.267
2.652	2.487	0.165
2.701	2.639	0.062
2.726	2.505	0.221
2.741	2.549	0.192
2.75	2.608	0.142
2.76	2.567	0.193
3.022	2.912	0.11
3.03	2.837	0.193
3.11	2.899	0.211
3.267	3.045	0.222
3.388	3.032	0.356
3.402	3.116	0.286
3.586	3.292	0.294
3.66	3.33	0.33
3.82	3.456	0.364
4.112	3.882	0.23



Grafikon 1. Prikaz rezultata analiza neotvaranih uzoraka krvi kod živih osoba

Tabela 5. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.566	\bar{x}	1.450	\bar{x}	0.115
SE	0.096	SE	0.089	SE	0.009
SD	0.963	SD	0.898	SD	0.091
Var	0.928	Var	0.808	Var	0.008
Min	0.101	Min	0.095	Min	0.002
Max	4.112	Max	3.882	Max	0.364

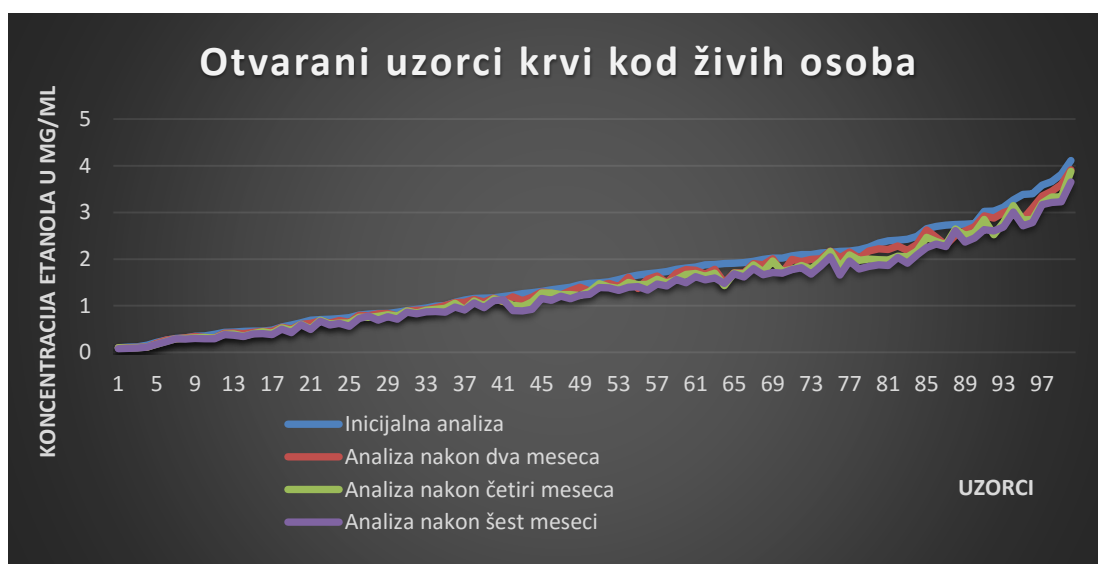
Testiranjem varijanse uzorka F-testom dobijene su vrednosti F (1,149) < F_{crit} (1,394), nakon čega je upoređivanjem rezultata srednjih vrednosti C₁ i C₆ t testom dobijena vrednost t (12,637) > t_{crit} (1,66), P < 0,001 (1.1307e-22).

Tabela 6. Analize otvaranih uzoraka krvi živih osoba (mg/ml)

Redni br.	C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
1	0.101	0.1	0.1	0.082	0.019
2	0.116	0.1	0.096	0.088	0.028
3	0.121	0.11	0.099	0.097	0.024
4	0.153	0.118	0.114	0.112	0.041
5	0.215	0.195	0.179	0.175	0.04
6	0.264	0.264	0.239	0.231	0.033
7	0.297	0.296	0.292	0.29	0.007
8	0.314	0.314	0.303	0.285	0.029
9	0.349	0.34	0.312	0.302	0.047
10	0.354	0.321	0.32	0.292	0.062
11	0.389	0.313	0.304	0.291	0.098
12	0.427	0.408	0.388	0.384	0.043
13	0.434	0.416	0.396	0.371	0.063
14	0.452	0.406	0.347	0.341	0.111
15	0.455	0.432	0.403	0.398	0.057
16	0.458	0.451	0.447	0.4	0.058
17	0.476	0.452	0.407	0.38	0.096
18	0.55	0.54	0.523	0.501	0.049
19	0.59	0.5	0.472	0.423	0.167
20	0.638	0.6	0.604	0.597	0.041
21	0.693	0.622	0.504	0.493	0.2
22	0.702	0.678	0.689	0.671	0.031
23	0.713	0.632	0.607	0.589	0.124
24	0.724	0.683	0.628	0.623	0.101
25	0.745	0.641	0.628	0.561	0.184
26	0.799	0.795	0.753	0.726	0.073
27	0.819	0.789	0.75	0.781	0.038
28	0.834	0.829	0.77	0.694	0.14
29	0.837	0.834	0.808	0.764	0.073
30	0.862	0.782	0.777	0.709	0.153
31	0.894	0.891	0.888	0.864	0.03
32	0.927	0.903	0.845	0.825	0.102
33	0.95	0.91	0.902	0.871	0.079
34	0.99	0.957	0.926	0.875	0.115
35	1.005	1.003	0.944	0.86	0.145
36	1.075	1.065	1.055	0.971	0.104
37	1.121	1.077	0.917	0.907	0.214
38	1.157	1.138	1.103	1.059	0.098

39	1.165	1.083	1.002	0.957	0.208
40	1.174	1.163	1.149	1.109	0.065
41	1.198	1.09	1.096	1.131	0.067
42	1.228	1.191	1.011	0.898	0.33
43	1.257	1.11	0.984	0.887	0.37
44	1.283	1.184	1.082	0.923	0.36
45	1.306	1.294	1.274	1.156	0.15
46	1.339	1.273	1.277	1.113	0.226
47	1.37	1.235	1.238	1.203	0.167
48	1.396	1.321	1.242	1.149	0.247
49	1.45	1.395	1.216	1.228	0.222
50	1.479	1.314	1.31	1.244	0.235
51	1.491	1.43	1.47	1.388	0.103
52	1.512	1.481	1.401	1.386	0.126
53	1.561	1.409	1.372	1.329	0.232
54	1.618	1.607	1.498	1.396	0.222
55	1.655	1.373	1.452	1.414	0.241
56	1.687	1.572	1.459	1.334	0.353
57	1.704	1.639	1.567	1.469	0.235
58	1.734	1.496	1.487	1.428	0.306
59	1.779	1.697	1.562	1.56	0.219
60	1.809	1.775	1.672	1.494	0.315
61	1.83	1.764	1.694	1.622	0.208
62	1.874	1.678	1.631	1.558	0.316
63	1.881	1.781	1.696	1.593	0.288
64	1.907	1.491	1.431	1.477	0.43
65	1.912	1.708	1.698	1.684	0.228
66	1.923	1.704	1.683	1.614	0.309
67	1.954	1.904	1.875	1.797	0.157
68	1.992	1.876	1.729	1.665	0.327
69	2.019	2.01	1.962	1.715	0.304
70	2.022	1.705	1.731	1.696	0.326
71	2.067	1.996	1.779	1.772	0.295
72	2.095	1.947	1.865	1.818	0.277
73	2.1	1.997	1.786	1.681	0.419
74	2.129	2.01	1.956	1.849	0.28
75	2.146	2.173	2.166	2.046	0.1
76	2.162	2.03	1.828	1.66	0.502
77	2.171	2.151	2.092	1.96	0.211
78	2.2	2.019	1.975	1.786	0.414
79	2.256	2.174	2.002	1.843	0.413

80	2.347	2.22	1.989	1.877	0.47
81	2.392	2.205	1.982	1.861	0.531
82	2.407	2.28	2.062	2.038	0.369
83	2.425	2.189	2.05	1.914	0.511
84	2.488	2.314	2.174	2.09	0.398
85	2.652	2.623	2.464	2.248	0.404
86	2.701	2.468	2.381	2.325	0.376
87	2.726	2.303	2.31	2.267	0.459
88	2.741	2.509	2.644	2.609	0.132
89	2.75	2.607	2.509	2.365	0.385
90	2.76	2.691	2.562	2.451	0.309
91	3.022	2.93	2.85	2.63	0.392
92	3.03	2.876	2.521	2.603	0.427
93	3.11	2.995	2.784	2.688	0.422
94	3.267	3.07	3.147	3.01	0.257
95	3.388	2.858	2.835	2.716	0.672
96	3.402	3.096	2.848	2.784	0.618
97	3.586	3.355	3.2	3.167	0.419
98	3.66	3.457	3.334	3.216	0.444
99	3.82	3.6	3.334	3.226	0.594
100	4.112	3.912	3.877	3.657	0.455



Grafikon 2. – Prikaz rezultata analiza otvaranih uzoraka krvi kod živih osoba

Tabela 7. Deskriptivna statistička obrada rezultata

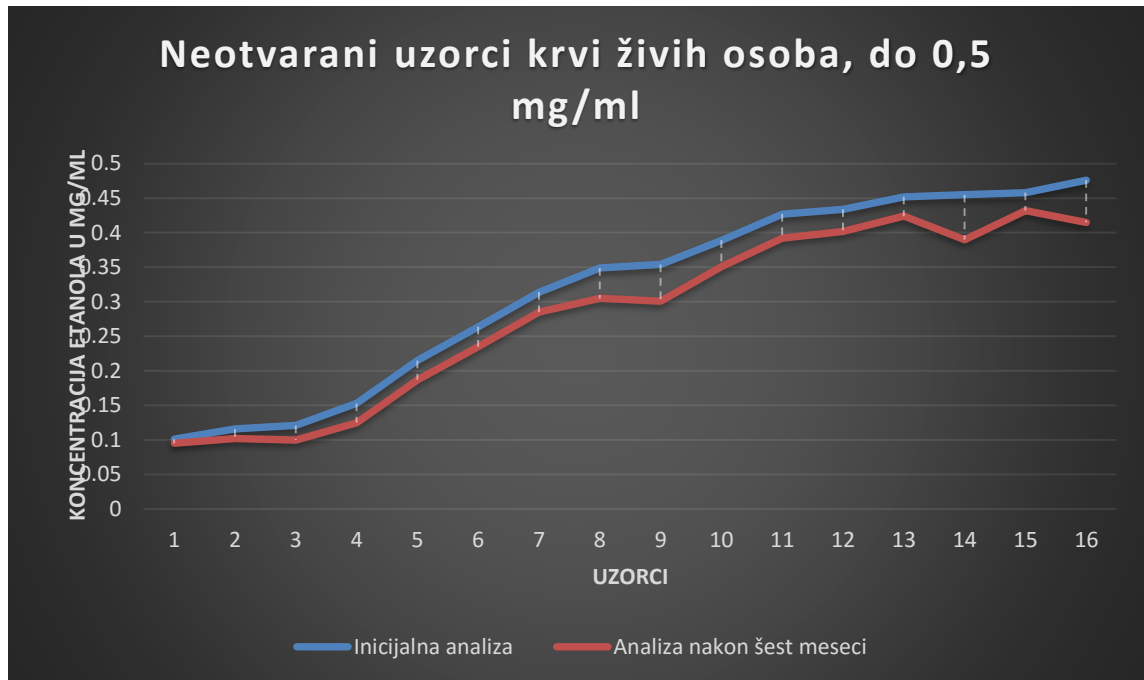
C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.566	\bar{x}	1.467	\bar{x}	1.4	\bar{x}	1.336	\bar{x}	0.229
SE	0.096	SE	0.09	SE	0.086	SE	0.083	SE	0.015
SD	0.963	SD	0.901	SD	0.865	SD	0.832	SD	0.159
Var	0.928	Var	0.811	Var	0.748	Var	0.692	Var	0.025
Min	0.101	Min	0.1	Min	0.096	Min	0.082	Min	0.007
Max	4.112	Max	3.912	Max	3.877	Max	3.657	Max	0.672

Testiranjem varijanse uzorka F-testom dobijene su vrednosti F (1,340) < F_{crit} (1,394), nakon čega je upoređivanjem rezultata srednjih vrednosti C₁ i C₆ t-testom dobijena vrednost t (14,372) > t_{crit} (1,66), p < 0,001 (P = 2.858e-26).

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika gde je t (6,17) > t_{crit} (1,652), p < 0,001 (1.88537e-09).

U narednom delu rezultata prikazani su grafički rezultati analiza krvi živih osoba, podeljeni prema stepenu alkoholemije, sa pripadajućim statističkim parametrima.

Grafikon 3. Analiza neatvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom do 0,5 mg/ml.



C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	0.317	\bar{x}	0.283	\bar{x}	0.033
SE	0.034	SE	0.031	SE	0.003
SD	0.136	SD	0.126	SD	0.015
Var	0.018	Var	0.016	Var	0.000
Min	0.101	Min	0.095	Min	0.006
Max	0.476	Max	0.432	Max	0.065

Tabela 8. Deskriptivna statistička obrada rezultata
 $t(8,499) > t_{crit}(1,753)$, $p < 0,001$ (2.03198E-07).

Grafikon 4. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom do 0,5 mg/ml.

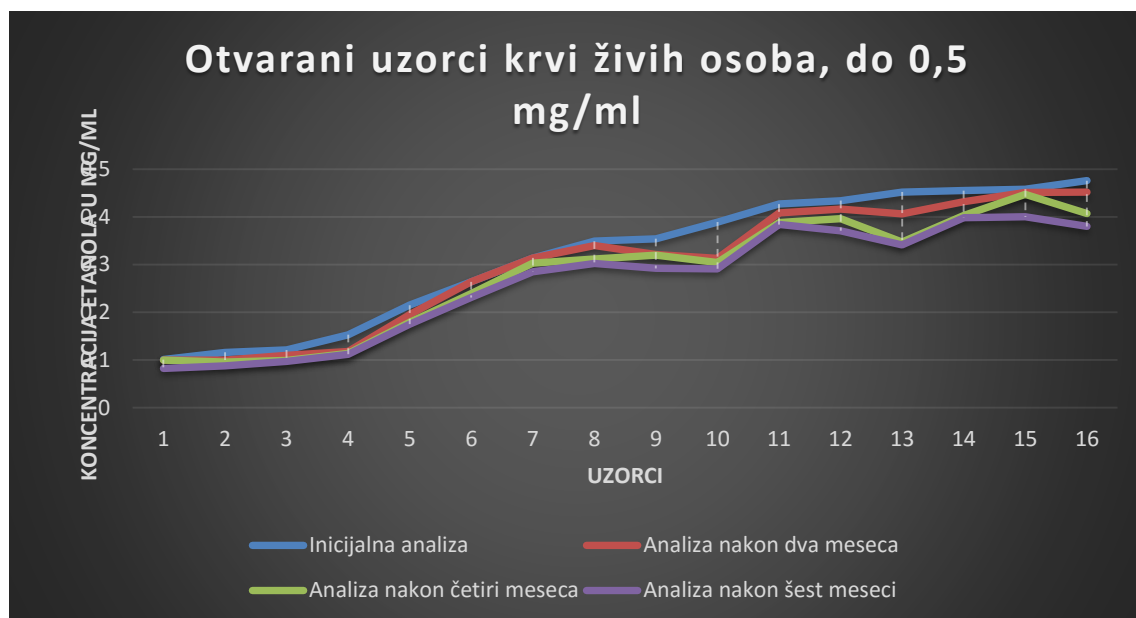


Tabela 9. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	0.317	\bar{x}	0.296	\bar{x}	0.278	\bar{x}	0.264	\bar{x}	0.053	
SE	0.034	SE	0.033	SE	0.031	SE	0.029	SE	0.006	
SD	0.136	SD	0.132	SD	0.124	SD	0.118	SD	0.027	
Var	0.018	Var	Var	Var	0.015	Var	0.013	Var	0.0007	
Min	0.101	Min	0.1	Min	0.096	Min	0.082	Min	0.019	
Max	0.476	Max	0.452	Max	0.447	Max	0.4	Max	0.111	

$$t(7,663) > t_{\text{crit}}(1,753), p < 0,001 (7.282e-07).$$

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(2,44) > t_{\text{crit}}(1,71), p < 0,05 (0,011)$.

Grafikon 5. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 0,5 - 1 mg/ml.

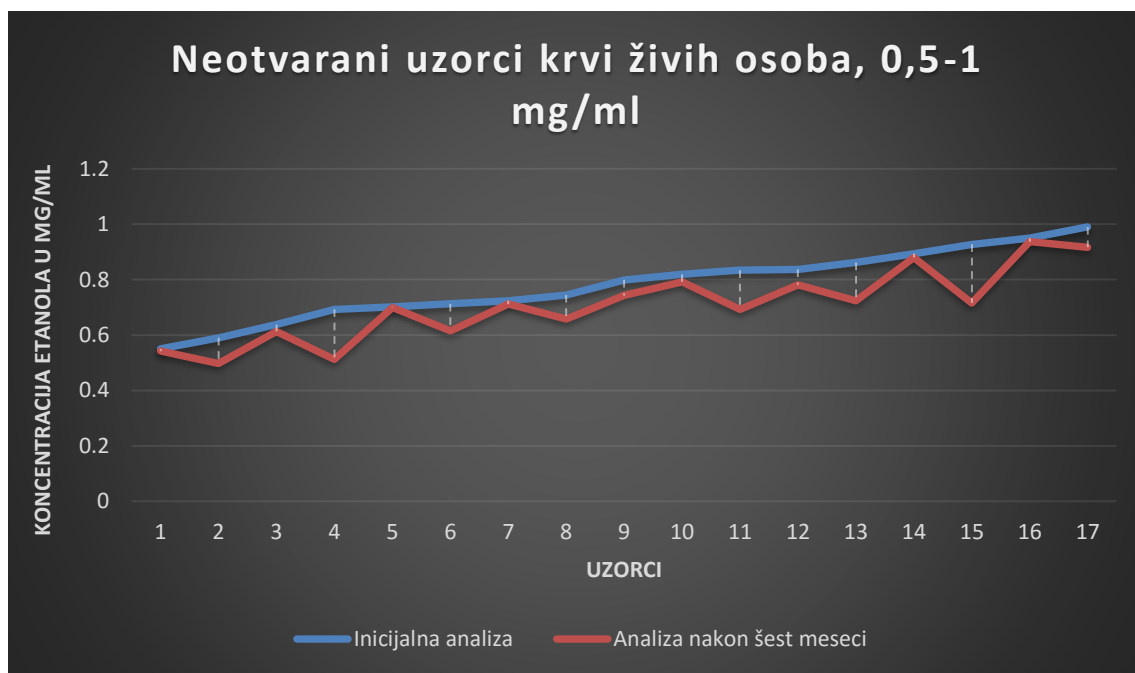


Tabela 10. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C₁		C₆		ΔC
\bar{x}	0.78	\bar{x}	0.707	\bar{x}	0.072
SE	0.031	SE	0.031	SE	0.015
SD	0.126	SD	0.13	SD	0.064
Var	0.015	Var	0.016	Var	0.004
Min	0.55	Min	0.497	Min	0.002
Max	0.99	Max	0.937	Max	0.211

$$t(4,664) > t_{\text{crit}}(1,745), p < 0,001 (0.0001).$$

Grafikon 6. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 0,5 - 1 mg/ml.

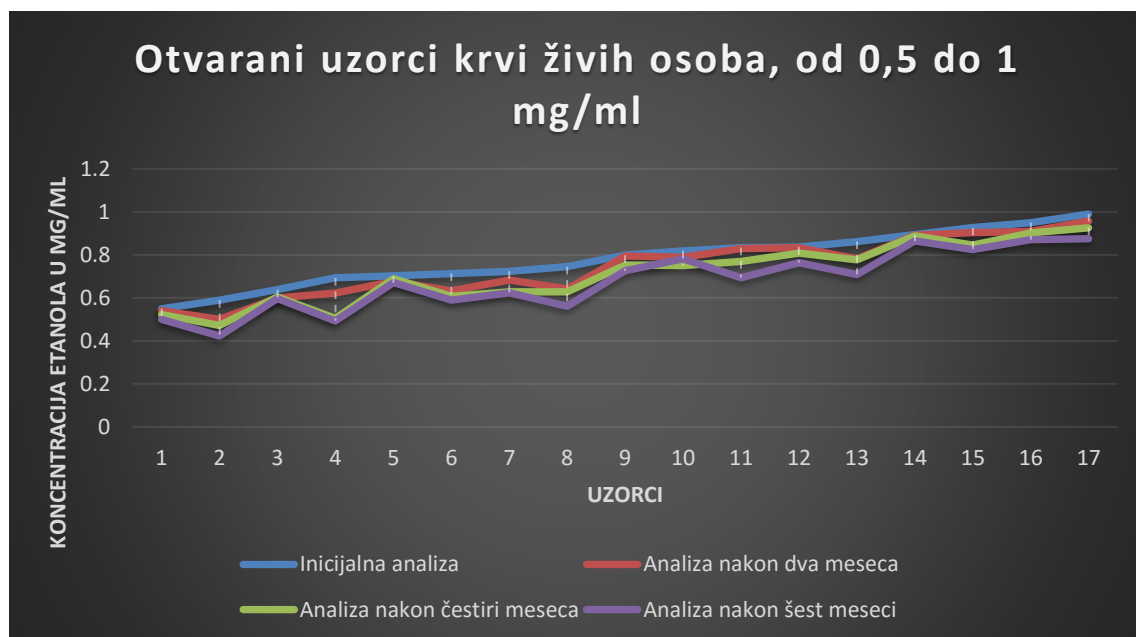


Tabela 11. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
\bar{x}	0.78	\bar{x} 0.74	\bar{x} 0.71	\bar{x} 0.68	\bar{x} 0.1
SE	0.031	SE 0.033	SE 0.034	SE 0.034	SE 0.013
SD	0.126	SD 0.138	SD 0.142	SD 0.14	SD 0.054
Var	0.015	Var 0.019	Var 0.02	Var 0.019	Var 0.003
Min	0.55	Min 0.5	Min 0.472	Min 0.423	Min 0.03
Max	0.99	Max 0.957	Max 0.926	Max 0.875	Max 0.2

$$t(7,508) > t_{\text{crit}}(1,745), P < 0,01 (6.249e-07)$$

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(1,33) < t_{\text{crit}}(1,693), p > 0,05 (0,095)$.

Grafikon 7. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 1 – 1,5 mg/ml.

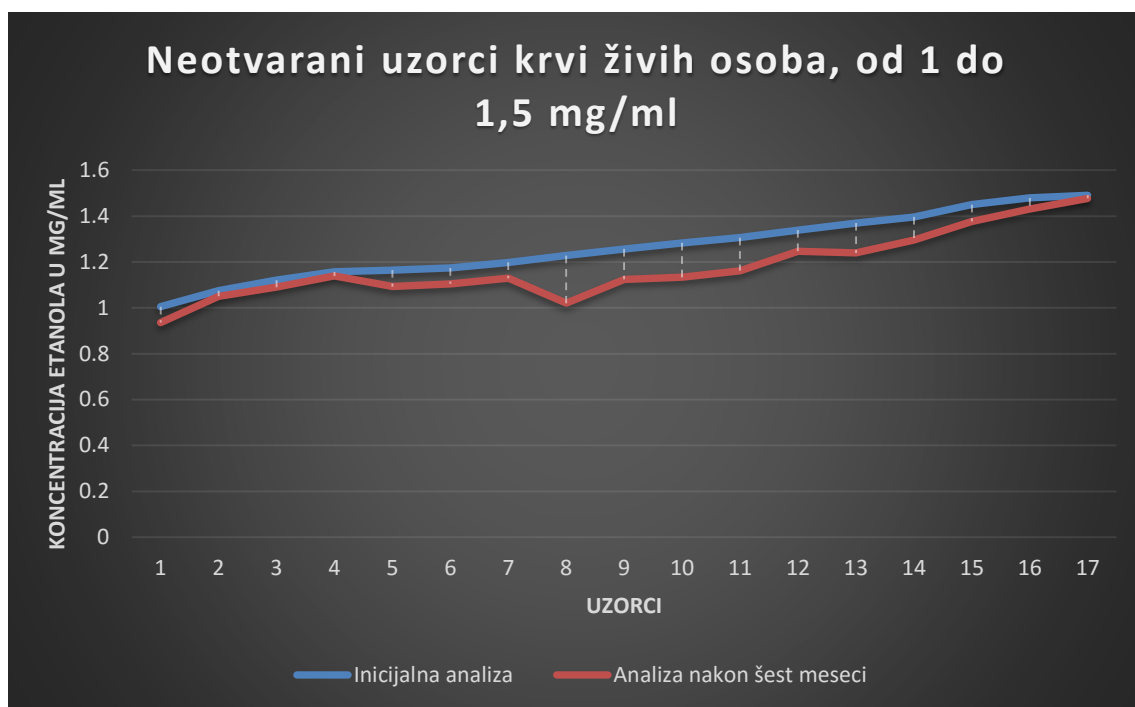


Tabela 12. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.264	\bar{x}	1.179	\bar{x}	0.085
SE	0.034	SE	0.035	SE	0.013
SD	0.142	SD	0.146	SD	0.053
Var	0.020	Var	0.021	Var	0.002
Min	1.005	Min	0.936	Min	0.014
Max	1.491	Max	1.477	max	0.208

$$t(6,544) > t_{\text{crit}}(1,745), p < 0,001 (3.375e-06).$$

Grafikon 8. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 1 – 1,5 mg/ml.

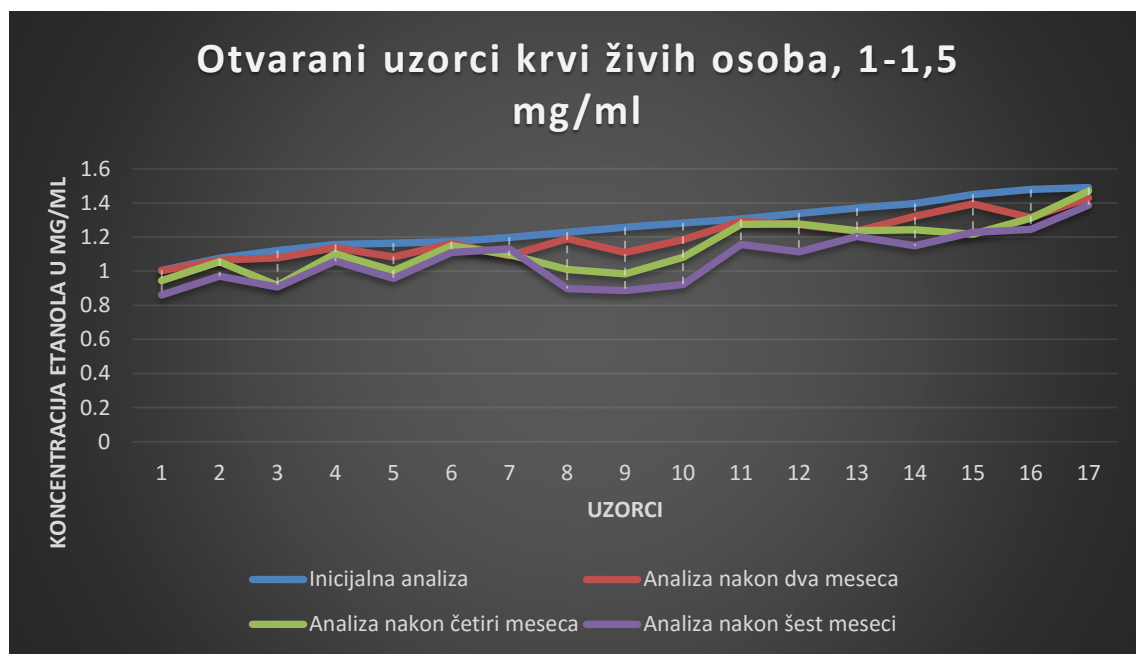


Tabela 13. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.264	\bar{x}	1.198	\bar{x}	1.139	\bar{x}	1.069	\bar{x}	0.194	
SE	0.034	SE	0.03	SE	0.036	SE	0.037	SE	0.023	
SD	0.142	SD	0.123	SD	0.15	SD	0.152	SD	0.096	
Var	0.02	Var	0.015	Var	0.022	Var	0.023	Var	0.009	
Min	1.005	Min	1.003	Min	0.917	Min	0.86	Min	0.065	
Max	1.491	Max	1.43	Max	1.47	Max	1.388	Max	0.37	

$t(8,368) > t_{crit}(1,753)$, $p < 0,001$ (1.539e-07).

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(4,109) > t_{crit}(1,708)$, $p < 0,001$ (0,0001).

Grafikon 9. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 1,5 – 2 mg/ml.

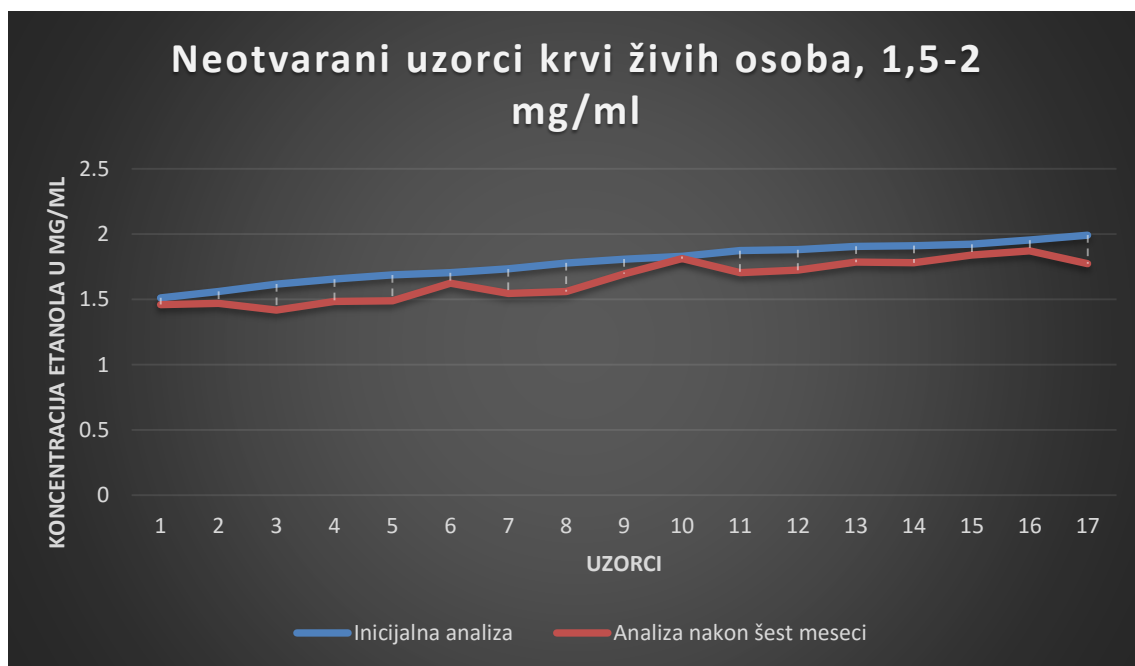


Tabela 14. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.784	\bar{x}	1.649	\bar{x}	0.134
SE	0.034	SE	0.036	SE	0.014
SD	0.143	SD	0.151	SD	0.061
Var	0.02	Var	0.022	Var	0.003
Min	1.512	Min	1.418	Min	0.018
Max	1.992	Max	1.872	Max	0.219

$$t(9,075) > t_{\text{crit}}(1,745), p < 0,001 (5.204e-08).$$

Grafikon 10. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 1,5 – 2 mg/ml.

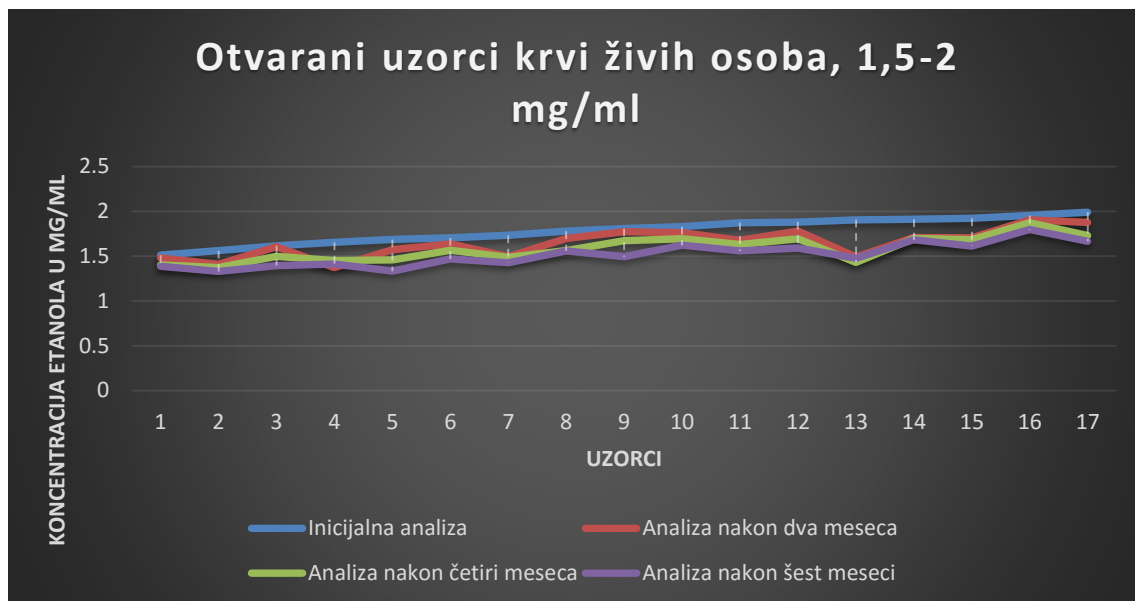


Tabela 15. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
\bar{x}	1.784	\bar{x} 1.644	\bar{x} 1.582	\bar{x} 1.518	\bar{x} 0.265
SE	0.034	SE 0.037	SE 0.034	SE 0.032	SE 0.018
SD	0.143	SD 0.156	SD 0.14	SD 0.132	SD 0.0751
Var	0.02	Var 0.024	Var 0.019	Var 0.017	Var 0.005
Min	1.512	Min 1.373	Min 1.372	Min 1.329	Min 0.126
Max	1.992	Max 1.904	Max 1.875	Max 1.797	Max 0.43

$t(14,57) > t_{crit}(1,745)$, $p < 0,001$ ($5.871e-11$).

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(5,56) > t_{crit}(1,693)$, $p < 0,001$ ($1.945e-06$).

Grafikon 11. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 2 – 2,5 mg/ml.

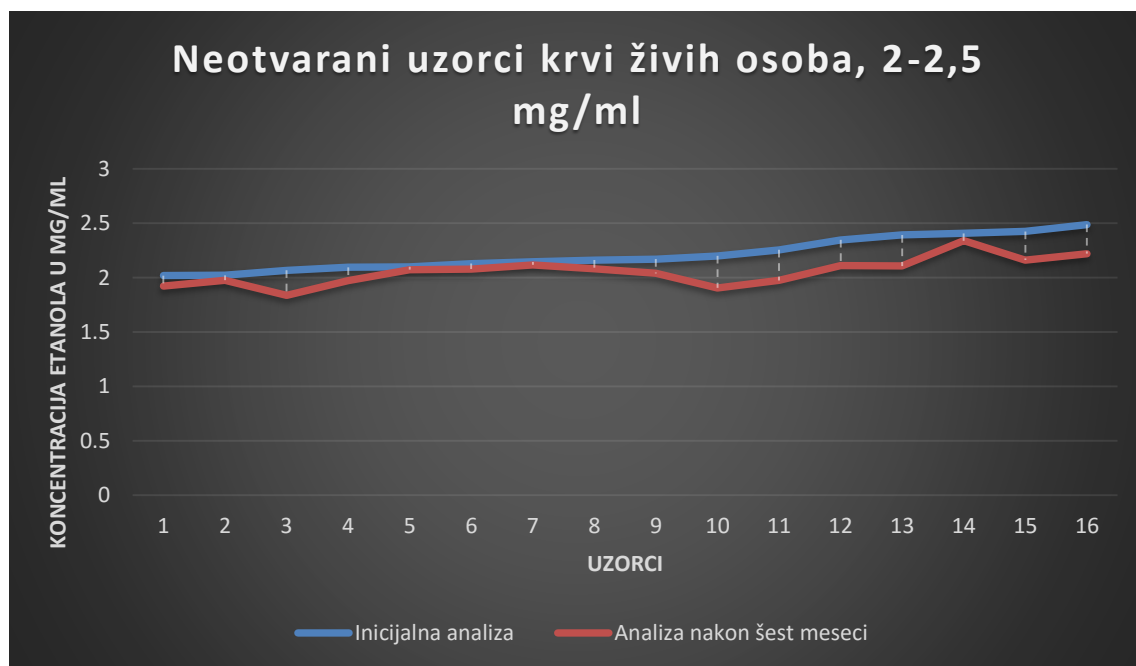


Tabela 16. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	2.214	\bar{x}	2.057	\bar{x}	0.156
SE	0.0380	SE	0.031	SE	0.026
SD	0.152	SD	0.126	SD	0.104
Var	0.023	Var	0.015	Var	0.011
Min	2.019	Min	1.837	Min	0.027
Max	2.488	Max	2.34	Max	0.295

$t(6,028) > t_{crit}(1,753), p < 0,001 (1.154e-05).$

Grafikon 12. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom 2 – 2,5 mg/ml.

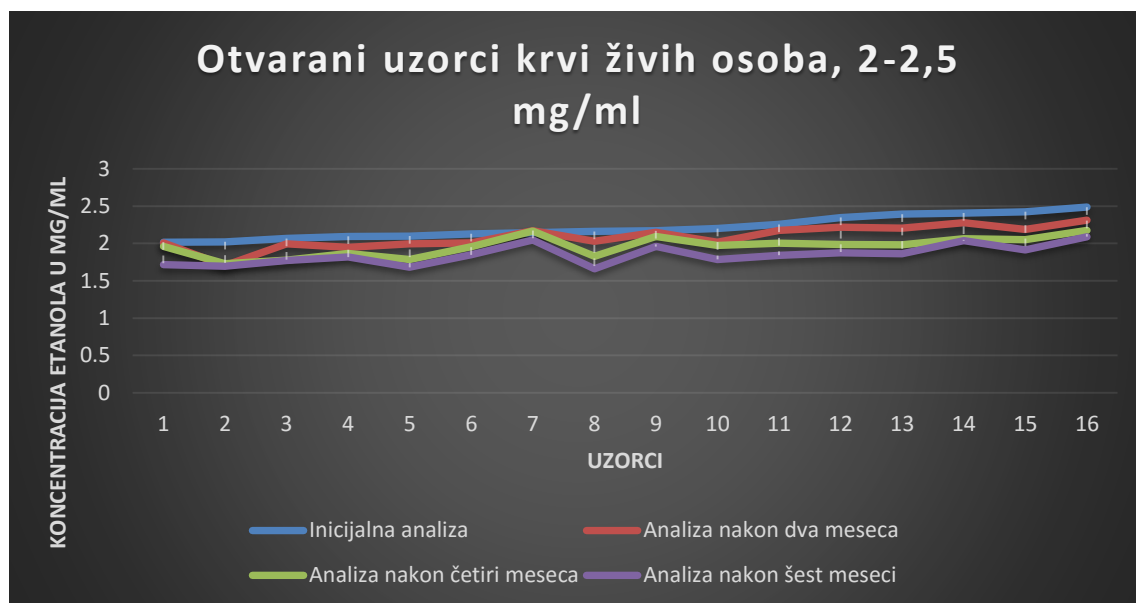


Tabela 17. Deskriptivna statistička obrada rezultata

	C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
\bar{x}	2.214	\bar{x} 2.088	\bar{x} 1.962	\bar{x} 1.850	\bar{x} 0.363
SE	0.038	SE 0.038	SE 0.033	SE 0.033	SE 0.029
SD	0.152	SD 0.153	SD 0.134	SD 0.133	SD 0.117
Var	0.023	Var 0.023	Var 0.018	Var 0.017	Var 0.013
Min	2.019	Min 1.705	Min 1.731	Min 1.66	Min 0.1
Max	2.488	Max 2.314	Max 2.174	Max 2.09	Max 0.531

$t(12,403) > t_{crit}(1,753), p < 0,001 (1.374e-09).$

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(5,382) > t_{crit}(1,699), p < 0,001 (4,382e^{-06}).$

Grafikon 13. Analiza neotvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom iznad 2,5 mg/ml.

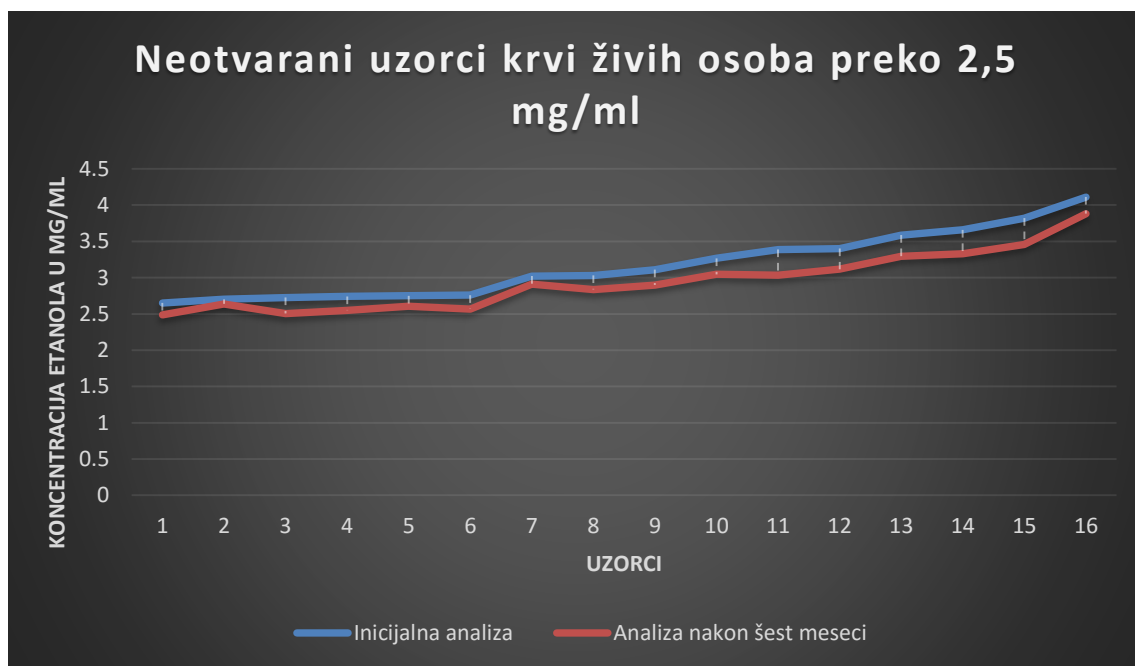


Tabela 18. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	3.17	\bar{x}	2.947	\bar{x}	0.223
SE	0.113	SE	0.099	SE	0.021
SD	0.454	SD	0.398	SD	0.085
Var	0.206	Var	0.158	Var	0.007
Min	2.652	Min	2.487	Min	0.062
Max	4.112	Max	3.882	Max	0.364

$$t(10,443) > t_{\text{crit}}(1,753), p < 0,001 (1.406e-08)$$

Grafikon 14. Analiza otvaranih uzoraka krvi živih osoba sa alkoholemijom iznad 2,5 mg/ml.

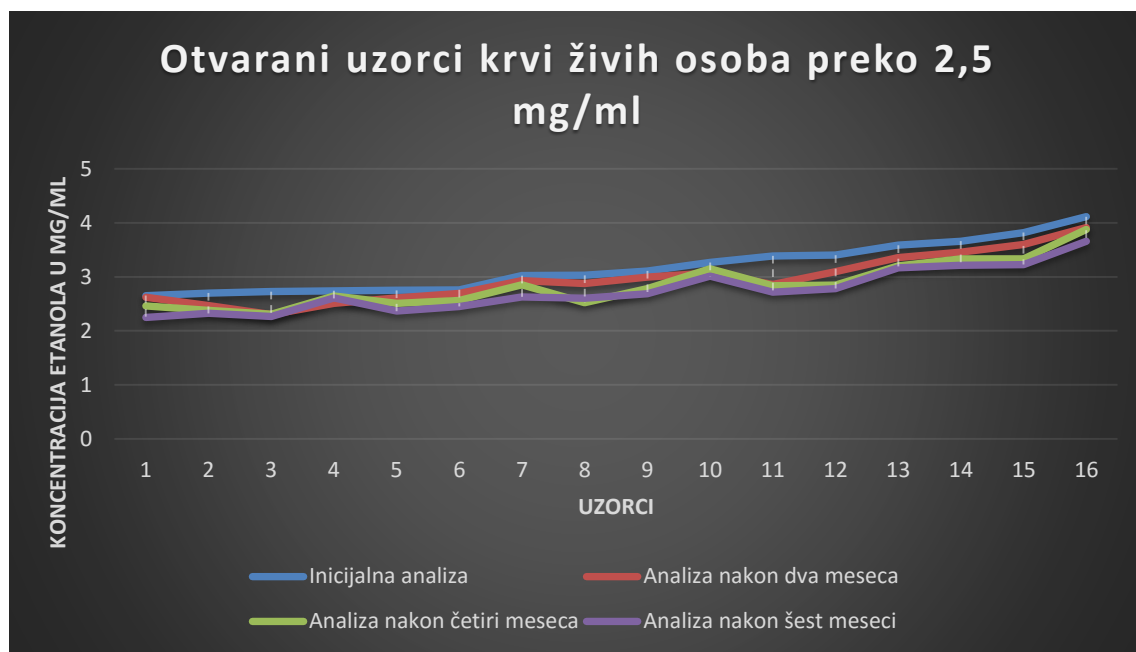


Tabela 19. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	3.17	\bar{x}	2.959	\bar{x}	2.85	\bar{x}	2.747	\bar{x}	0.422
SE	0.113	SE	0.111	SE	0.107	SE	0.101	SE	0.033
SD	0.454	SD	0.443	SD	0.428	SD	0.406	SD	0.132
Var	0.206	Var	0.197	Var	0.183	Var	0.164	Var	0.017
Min	2.652	Min	2.303	Min	2.31	Min	2.248	Min	0.132
Max	4.112	Max	3.912	Max	3.877	Max	3.657	Max	0.672

$t(12,79) > t_{crit}(1,753), p < 0,001 (8.996e-10)$.

Poređenjem srednjih vrednosti ΔC otvaranih i neotvaranih uzoraka dobijeno je $t(5,071) > t_{crit}(1,697), p < 0,001 (9,522e-06)$.

ANALIZE BIOLOŠKIH UZORAKA AUTOPSIJSKOG MATERIJALA

Tabela 20. Analize neotvaranih uzoraka krvi

C ₁	C ₆	ΔC
0.389	0.357	0.032
0.398	0.344	0.054
0.411	0.312	0.099
0.454	0.349	0.105
0.543	0.476	0.067
0.571	0.502	0.069
0.622	0.517	0.105
0.662	0.547	0.115
0.684	0.577	0.107
0.724	0.617	0.107
0.765	0.671	0.094
0.769	0.701	0.068
0.773	0.617	0.156
0.782	0.628	0.154
0.903	0.846	0.057
0.912	0.811	0.101
0.914	0.856	0.058
0.942	0.843	0.099
1.016	0.977	0.039
1.076	0.986	0.09
1.095	0.982	0.113
1.112	1.105	0.007
1.112	1.011	0.101
1.116	0.993	0.123
1.123	1.018	0.105
1.159	0.901	0.258
1.227	1.111	0.116
1.231	1.113	0.118
1.249	1.191	0.058
1.268	1.196	0.072

1.308	1.2	0.108
1.328	1.21	0.118
1.355	1.315	0.04
1.367	1.322	0.045
1.421	1.376	0.045
1.43	1.356	0.074
1.487	1.349	0.138
1.496	1.358	0.138
1.527	1.458	0.069
1.552	1.469	0.083
1.578	1.411	0.167
1.591	1.435	0.156
1.627	1.422	0.205
1.643	1.431	0.212
1.657	1.532	0.125
1.692	1.632	0.06
1.79	1.611	0.179
1.816	1.719	0.097
1.886	1.543	0.343
1.982	1.671	0.311
2.041	1.954	0.087
2.141	1.879	0.262
2.234	2.093	0.141
2.243	1.981	0.262
2.245	1.993	0.252
2.443	2.017	0.426
2.512	2.22	0.292
2.722	2.328	0.394
2.997	2.672	0.325
3.154	2.772	0.382

Grafikon 15. Analiza neotvaranih autopsijskih uzoraka krvi

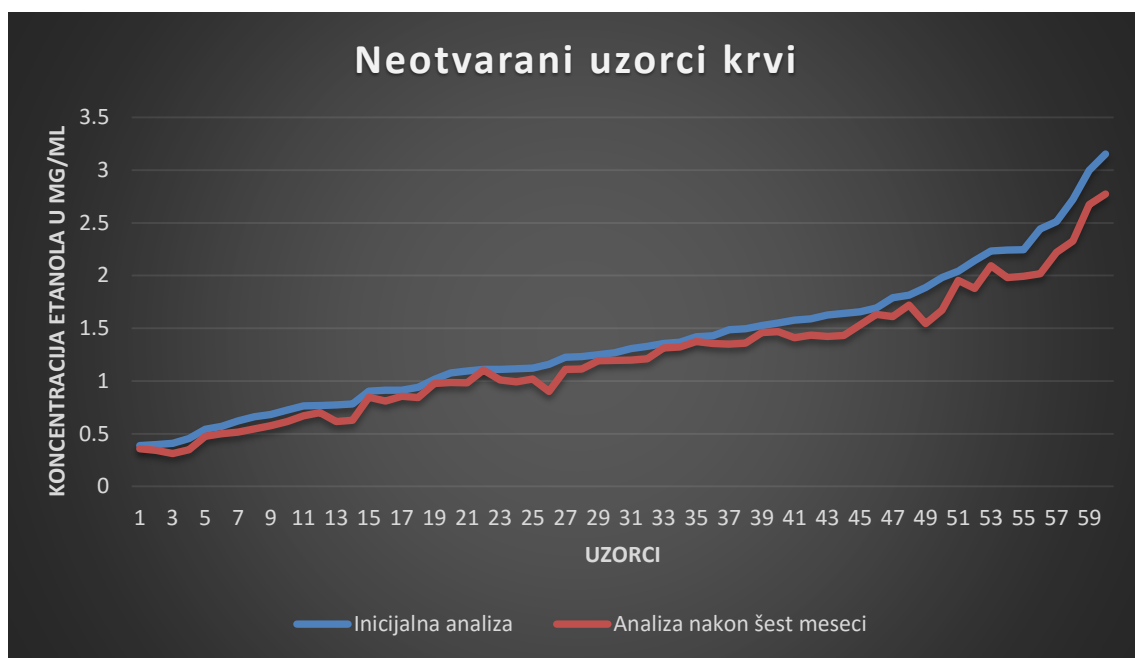


Tabela 21. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		Δc	
\bar{x}	1.371	\bar{x}	1.218	\bar{x}	0.153
SE	0.083	SE	0.077	SE	0.0197
SD	0.648	SD	0.596	SD	0.152
Var	0.42	Var	0.356	Var	0.023
Min	0.389	Min	0.101	Min	0.007
Max	3.154	Max	2.772	Max	1.058

$$t(11,09) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (2.306e^{-16}).$$

Tabela 22. Analize neotvaranih uzoraka urina

C ₁	C ₆	ΔC
0.521	0.497	0.024
0.543	0.492	0.051
0.709	0.671	0.038
0.715	0.692	0.023
0.326	0.299	0.027
0.344	0.317	0.027
0.912	0.887	0.025
0.952	0.892	0.06
0.571	0.518	0.053
0.611	0.533	0.078
0.865	0.819	0.046
0.885	0.839	0.046
0.915	0.91	0.005
0.925	0.9	0.025
1.815	1.717	0.098
0.881	0.785	0.096
1.215	1.007	0.208
0.897	0.791	0.106
1.341	1.222	0.119
1.351	1.244	0.107
1.417	1.312	0.105
1.567	1.512	0.055
1.453	1.441	0.012
1.344	1.312	0.032
1.458	1.437	0.021
1.374	1.322	0.052
1.573	1.515	0.058
1.585	1.521	0.064
1.545	1.512	0.033
1.575	1.519	0.056

1.993	1.871	0.122
2.193	2.002	0.191
2.783	2.656	0.127
2.483	2.256	0.227
1.394	1.317	0.077
1.794	1.517	0.277
1.56	1.449	0.111
1.67	1.469	0.201
1.648	1.587	0.061
1.858	1.595	0.263
1.432	1.42	0.012
1.894	1.62	0.274
1.892	1.722	0.17
1.917	1.822	0.095
2.012	1.811	0.201
2.005	1.815	0.19
2.118	1.915	0.203
2.111	2.015	0.096
2.228	2.09	0.138
2.247	1.999	0.248
3.231	3.011	0.22
2.992	2.803	0.189
2.987	2.813	0.174
2.788	2.639	0.149
2.983	2.82	0.163
2.888	2.637	0.251
2.989	2.875	0.114
3.286	2.895	0.391
3.697	3.458	0.239
3.797	3.488	0.309

Grafikon 16. Analiza neotvaranih autopsijskih uzoraka urina

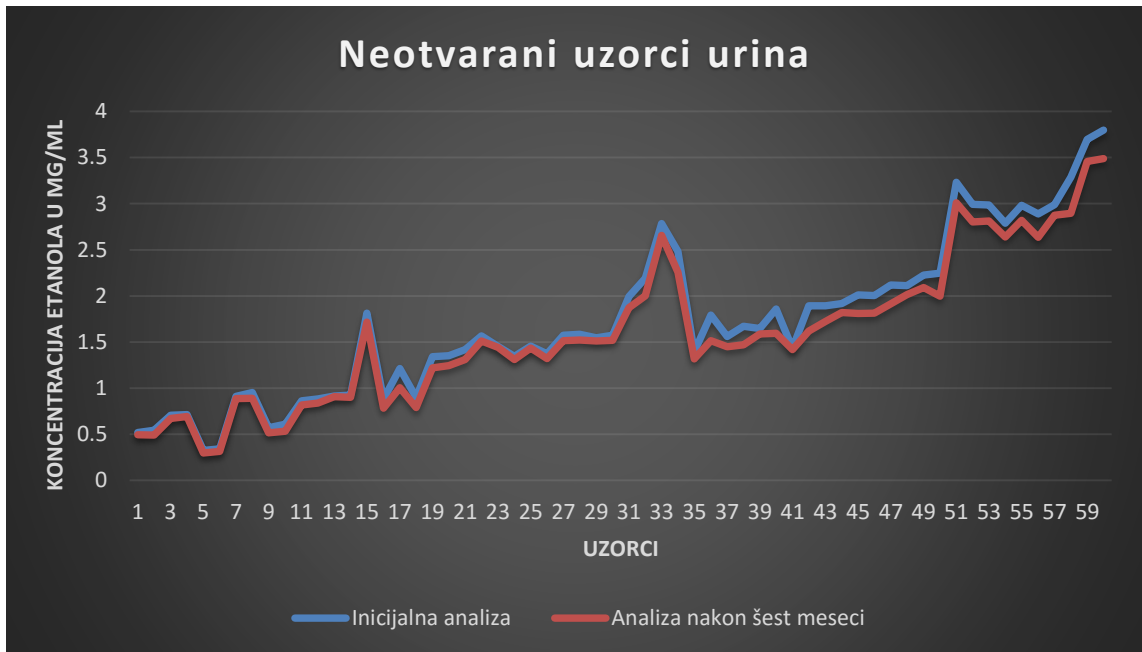


Tabela 23. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.717	\bar{x}	1.597	\bar{x}	0.12
SE	0.11	SE	0.102	SE	0.011
SD	0.853	SD	0.79	SD	0.089
Var	0.728	Var	0.624	Var	0.008
Min	0.326	Min	0.299	Min	0.005
Max	3.797	Max	3.488	Max	0.391

$$t(10,451) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (2.735e^{-15}).$$

Tabela 24. Analize neotvaranih autopsijskih uzoraka staklastog tela

C ₁	C ₆	ΔC
0.47	0.46	0.01
0.483	0.458	0.025
0.691	0.664	0.027
0.705	0.688	0.017
0.386	0.377	0.009
0.418	0.381	0.037
0.871	0.791	0.08
0.917	0.791	0.126
0.598	0.557	0.041
0.622	0.587	0.035
0.887	0.871	0.016
0.898	0.866	0.032
0.895	0.817	0.078
0.897	0.837	0.06
1.087	0.997	0.09
0.887	0.805	0.082
1.078	0.999	0.079
0.915	0.901	0.014
1.214	1.119	0.095
1.22	1.111	0.109
1.453	1.449	0.004
1.493	1.469	0.024
1.511	1.452	0.059
1.308	1.267	0.041
1.517	1.492	0.025
1.348	1.287	0.061
1.439	1.391	0.048
1.449	1.401	0.048
1.555	1.508	0.047
1.565	1.517	0.048
1.901	1.879	0.022
1.914	1.896	0.018
1.658	1.647	0.011
1.666	1.637	0.029
1.43	1.39	0.04
1.831	1.79	0.041
1.561	1.531	0.03

1.568	1.536	0.032
1.611	1.574	0.037
1.631	1.57	0.061
1.55	1.388	0.162
1.75	1.588	0.162
1.874	1.687	0.187
1.889	1.667	0.222
1.953	1.797	0.156
1.843	1.759	0.084
1.939	1.88	0.059
1.931	1.881	0.05
2.008	1.918	0.09
2.019	1.879	0.14
2.618	2.597	0.021
2.715	2.59	0.125
2.514	2.477	0.037
2.657	2.462	0.195
2.519	2.487	0.032
2.706	2.661	0.045
2.766	2.712	0.054
2.986	2.701	0.285
3.372	3.322	0.05
3.572	3.306	0.266

Grafikon 17. Analiza neotvaranih autopsijskih uzoraka staklastog tela

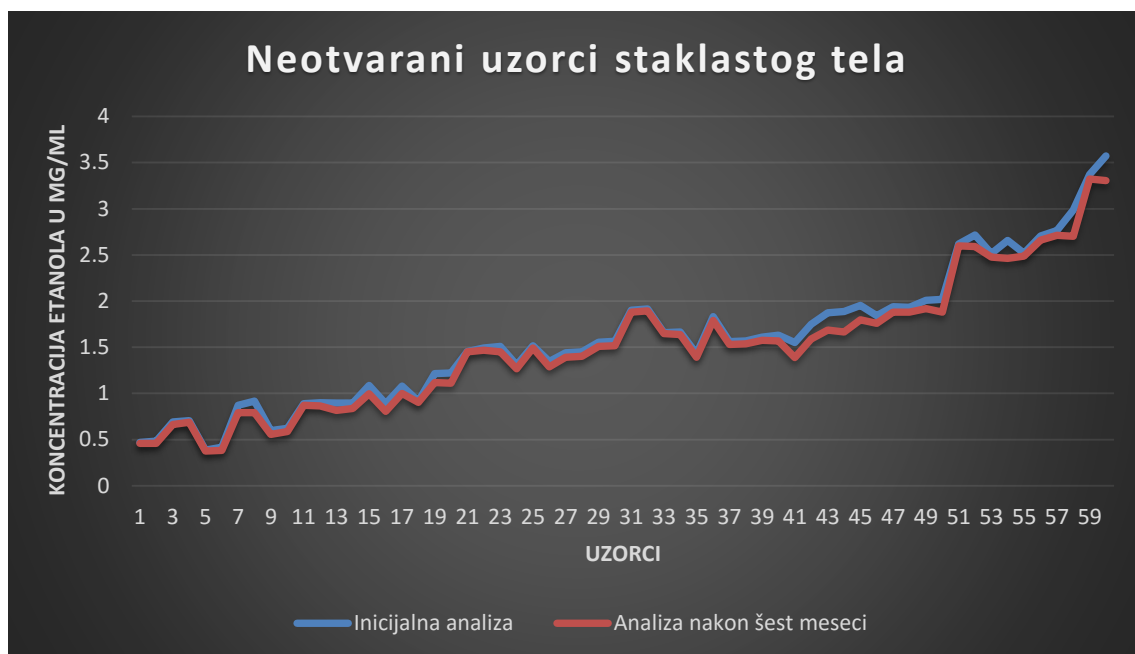


Tabela 25. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.579	\bar{x}	1.508	\bar{x}	0.07
SE	0.094	SE	0.091	SE	0.008
SD	0.734	SD	0.708	SD	0.063
Var	0.539	Var	0.502	Var	0.0039
Min	0.386	Min	0.377	Min	0.004
Max	3.572	Max	3.322	Max	0.285

$$t(8,609) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (2.566e^{-12}).$$

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji (ΔC) krvi, urina i staklastog tela neotvaranih uzoraka, dobijene su sledeće vrednosti:

Krv - Urin: $t (1,419) < t_{crit} (1,661), p > 0,05 (0,079)$

Krv - Staklasto telo: $t (3,88) > t_{crit} (1,664), p < 0,05 (0,0001)$.

Urin - Staklasto telo: $t (3,559) > t_{crit} (1,659), p < 0,05 (0,0002)$.

Tabela 26. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka krvi

C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
0.389	0.365	0.322	0.301	0.088
0.398	0.371	0.317	0.296	0.102
0.411	0.349	0.295	0.287	0.124
0.454	0.394	0.355	0.308	0.146
0.543	0.52	0.515	0.452	0.091
0.571	0.54	0.539	0.49	0.081
0.622	0.677	0.492	0.488	0.134
0.662	0.657	0.511	0.528	0.134
0.684	0.612	0.569	0.491	0.193
0.724	0.632	0.589	0.539	0.185
0.765	0.569	0.572	0.511	0.254
0.769	0.589	0.578	0.521	0.248
0.773	0.71	0.614	0.556	0.217
0.782	0.723	0.654	0.6	0.182
0.903	0.883	0.877	0.823	0.08
0.912	0.879	0.779	0.759	0.153
0.914	0.893	0.887	0.833	0.081
0.942	0.898	0.819	0.787	0.155
1.016	0.776	0.781	0.765	0.251
1.076	0.797	0.791	0.761	0.315
1.095	1.001	0.97	0.887	0.208
1.112	1.11	0.98	1.001	0.111
1.112	0.926	0.881	0.876	0.236
1.116	1.101	0.993	0.861	0.255
1.123	0.956	0.921	0.886	0.237
1.159	1.121	0.902	0.871	0.288
1.227	1.221	1.118	0.968	0.259
1.231	1.226	1.12	1.008	0.223
1.249	1.117	1.096	0.987	0.262
1.268	1.137	1.096	0.993	0.275
1.308	1.269	1.256	1.11	0.198
1.328	1.288	1.274	1.114	0.214
1.355	1.219	1.207	1.188	0.167
1.367	1.229	1.217	1.187	0.18
1.421	1.437	1.395	1.311	0.11
1.43	1.417	1.391	1.311	0.119
1.487	1.298	1.281	1.266	0.221
1.496	1.299	1.291	1.261	0.235
1.527	1.379	1.391	1.376	0.151
1.552	1.409	1.39	1.386	0.166
1.578	1.467	1.32	1.306	0.272

1.591	1.497	1.328	1.317	0.274
1.627	1.429	1.371	1.249	0.378
1.643	1.457	1.392	1.229	0.414
1.657	1.611	1.487	1.377	0.28
1.692	1.618	1.61	1.577	0.115
1.79	1.641	1.591	1.45	0.34
1.816	1.711	1.692	1.653	0.163
1.886	1.659	1.642	1.567	0.319
1.982	1.699	1.651	1.565	0.417
2.041	1.997	2.056	1.892	0.149
2.141	2.097	1.897	1.701	0.44
2.234	2.002	1.992	1.975	0.259
2.243	1.891	1.776	1.781	0.462
2.245	2.009	1.997	1.77	0.475
2.443	1.997	1.976	1.883	0.56
2.512	2.387	2.119	1.978	0.534
2.722	2.489	2.419	2.018	0.704
2.997	2.865	2.541	2.396	0.601
3.154	2.875	2.841	2.496	0.658

Grafikon 18. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka krvi

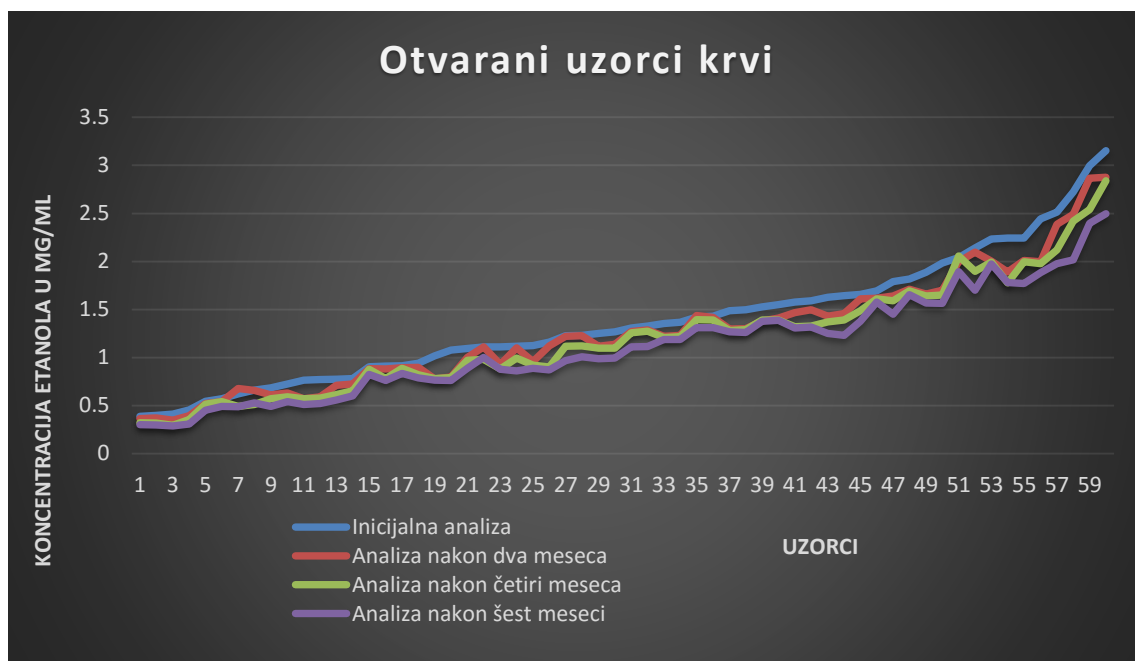


Tabela 27. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.371	\bar{x}	1.256	\bar{x}	1.182	\bar{x}	1.118	\bar{x}	0.252
SE	0.083	SE	0.077	SE	0.077	SE	0.069	SE	0.018
SD	0.648	SD	0.598	SD	0.598	SD	0.536	SD	0.146
Var	0.42	Var	0.358	Var	0.358	Var	0.288	Var	0.0215
Min	0.389	Min	0.349	Min	0.102	Min	0.287	Min	0.08
Max	3.154	Max	2.875	Max	2.841	Max	2.496	Max	0.704

$$t(13,325) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (9.586e^{-20}).$$

Tabela 28. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka urina

C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
0.521	0.469	0.401	0.398	0.123
0.543	0.467	0.398	0.388	0.155
0.709	0.673	0.614	0.534	0.175
0.715	0.697	0.666	0.615	0.1
0.326	0.318	0.298	0.288	0.038
0.344	0.328	0.301	0.298	0.046
0.912	0.858	0.84	0.815	0.097
0.952	0.877	0.851	0.833	0.119
0.571	0.554	0.521	0.471	0.1
0.611	0.585	0.561	0.51	0.101
0.865	0.841	0.821	0.796	0.069
0.885	0.863	0.844	0.797	0.088
0.915	0.912	0.887	0.814	0.101
0.925	0.917	0.897	0.804	0.121
1.815	1.676	1.605	1.616	0.199
0.881	0.769	0.715	0.678	0.203
1.215	1.176	1.105	0.916	0.299
0.897	0.779	0.745	0.698	0.199
1.341	1.234	1.119	1.114	0.227
1.351	1.244	1.129	1.115	0.236
1.417	1.374	1.361	1.309	0.108
1.576	1.532	1.469	1.413	0.163
1.453	1.417	1.422	1.431	0.022
1.344	1.279	1.275	1.267	0.077
1.458	1.437	1.422	1.361	0.097
1.374	1.299	1.285	1.266	0.108
1.573	1.544	1.471	1.437	0.136
1.585	1.563	1.492	1.457	0.128
1.545	1.571	1.456	1.481	0.064
1.575	1.471	1.466	1.457	0.118
1.993	1.809	1.779	1.694	0.299
2.193	2.19	2	2.021	0.172
2.783	2.231	2.117	2.224	0.559
2.483	2.132	2.103	2.114	0.369
1.394	1.221	1.22	1.197	0.197
1.794	1.621	1.57	1.497	0.297
1.56	1.329	1.308	1.283	0.277
1.67	1.429	1.378	1.286	0.384
1.648	1.627	1.462	1.443	0.205
1.858	1.643	1.471	1.433	0.425

1.432	1.298	1.281	1.285	0.147
1.894	1.685	1.581	1.514	0.38
1.892	1.763	1.73	1.661	0.231
1.917	1.867	1.83	1.761	0.156
2.012	1.87	1.784	1.703	0.309
2.005	1.776	1.784	1.692	0.313
2.118	1.988	1.977	1.898	0.22
2.111	2.129	1.977	1.898	0.213
2.228	2.117	2.053	1.982	0.246
2.247	2.108	2.043	1.876	0.371
3.231	3.119	3.005	2.896	0.335
2.992	2.864	2.761	2.654	0.338
2.987	2.871	2.772	2.76	0.227
2.788	2.587	2.565	2.412	0.376
2.983	2.863	2.778	2.691	0.292
2.888	2.686	2.559	2.432	0.456
2.989	2.864	2.814	2.678	0.311
3.286	3.112	2.995	2.779	0.507
3.697	3.335	3.329	3.271	0.426
3.797	3.511	3.432	3.401	0.396

Grafikon 19. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka urina

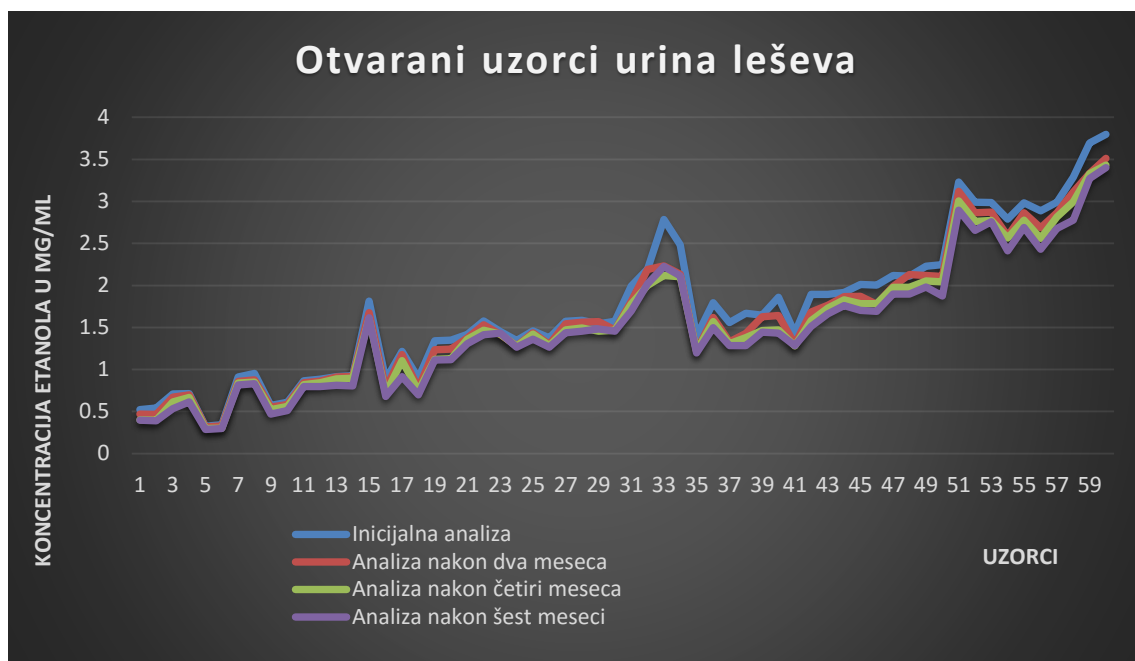


Tabela 29. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.717	\bar{x}	1.606	\bar{x}	1.548	\bar{x}	1.496	\bar{x}	0.22
SE	0.11	SE	0.102	SE	0.1	SE	0.098	SE	0.016
SD	0.853	SD	0.795	SD	0.778	SD	0.761	SD	0.126
Var	0.728	Var	0.632	Var	0.606	Var	0.579	Var	0.016
Min	0.326	Min	0.318	Min	0.298	Min	0.288	Min	0.022
Max	3.797	Max	3.511	Max	3.432	Max	3.401	Max	0.559

$$t(13,489) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (5.55e^{-20}).$$

Tabela 30. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka staklastog tela

C ₁	C ₂	C ₄	C ₆	ΔC
0.47	0.458	0.433	0.42	0.05
0.483	0.446	0.421	0.397	0.086
0.691	0.678	0.687	0.655	0.036
0.705	0.688	0.677	0.67	0.035
0.386	0.367	0.373	0.365	0.021
0.418	0.387	0.377	0.369	0.049
0.871	0.822	0.776	0.777	0.094
0.917	0.862	0.816	0.81	0.107
0.598	0.569	0.585	0.522	0.076
0.622	0.599	0.591	0.582	0.04
0.887	0.88	0.809	0.776	0.111
0.898	0.8	0.799	0.796	0.102
0.895	0.861	0.805	0.772	0.123
0.897	0.871	0.826	0.779	0.118
1.087	1.137	1.095	1.011	0.076
0.887	0.882	0.89	0.82	0.067
1.078	1	0.95	0.91	0.168
0.915	0.892	0.89	0.82	0.095
1.214	1.117	1.11	1.007	0.207
1.22	1.119	1	1.001	0.219
1.453	1.39	1.386	1.351	0.102
1.493	1.39	1.346	1.331	0.162
1.511	1.488	1.476	1.402	0.109
1.308	1.291	1.224	1.118	0.19
1.517	1.498	1.486	1.432	0.085
1.348	1.297	1.264	1.218	0.13
1.439	1.431	1.396	1.352	0.087
1.449	1.431	1.398	1.372	0.077
1.555	1.495	1.515	1.497	0.058
1.565	1.502	1.496	1.489	0.076
1.901	1.889	1.872	1.754	0.147
1.914	1.879	1.902	1.874	0.04
1.658	1.762	1.676	1.611	0.047
1.666	1.602	1.576	1.554	0.112
1.43	1.567	1.48	1.42	0.01
1.831	1.767	1.748	1.692	0.139
1.561	1.538	1.546	1.439	0.122
1.568	1.528	1.526	1.501	0.067
1.611	1.558	1.562	1.498	0.113
1.631	1.588	1.556	1.502	0.129

1.55	1.561	1.345	1.289	0.261
1.75	1.661	1.545	1.498	0.252
1.874	1.819	1.781	1.65	0.224
1.889	1.819	1.777	1.692	0.197
1.953	1.846	1.792	1.728	0.225
1.843	1.753	1.692	1.678	0.165
1.939	1.837	1.786	1.741	0.198
1.931	1.818	1.775	1.765	0.166
2.008	2.11	1.985	1.972	0.036
2.019	1.976	1.965	1.816	0.203
2.618	2.5	2.521	2.52	0.098
2.715	2.6	2.591	2.52	0.195
2.514	2.507	2.484	2.319	0.195
2.657	2.566	2.513	2.457	0.2
2.519	2.509	2.494	2.321	0.198
2.706	2.661	2.514	2.45	0.256
2.766	2.73	2.708	2.666	0.1
2.986	2.73	2.618	2.566	0.42
3.372	3.312	3.11	3.115	0.257
3.572	3.381	3.299	3.207	0.365

Grafikon 20. Analize otvaranih autopsijskih uzoraka staklastog tela



Tabela 31. Deskriptivna statistička obrada rezultata

C ₁		C ₂		C ₄		C ₆		ΔC	
\bar{x}	1.578	\bar{x}	1.533	\bar{x}	1.494	\bar{x}	1.443	\bar{x}	0.134
SE	0.094	SE	0.092	SE	0.089	SE	0.088	SE	0.01
SD	0.734	SD	0.713	SD	0.696	SD	0.683	SD	0.082
Var	0.539	Var	0.508	Var	0.485	Var	0.466	Var	0.006
Min	0.386	Min	0.367	Min	0.373	Min	0.365	Min	0.01
Max	3.572	Max	3.381	Max	3.299	Max	3.207	Max	0.42

$$t(12,645) > t_{\text{crit}}(1,671), p < 0,001 (9.586e^{-19}).$$

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji (ΔC) krvi, urina i staklastog tela neotvaranih uzoraka, dobijene su sledeće vrednosti:

$$\text{Krv} - \text{Urin}: t(1,259) < t_{\text{crit}}(1,657), p > 0,05 (0,105)$$

$$\text{Krv} - \text{Staklasto telo}: t(5,405) > t_{\text{crit}}(1,661), p < 0,05 (2,482e^{-07}).$$

$$\text{Urin} - \text{Staklasto telo}: t(4,399) > t_{\text{crit}}(1,66), p < 0,05 (1,346e^{-05}).$$

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji (ΔC) krvi, urina i staklastog tela između otvaranih i neotvaranih uzoraka, dobijene su sledeće vrednosti:

$$\text{Krv}_o - \text{Krv}_n: t(3,63) > t_{\text{crit}}(1,657), p < 0,05 (0,0002).$$

$$\text{Urin}_o - \text{Urin}_n: t(5,002) > t_{\text{crit}}(1,659), p < 0,05 (1,128e^{-06}).$$

$$\text{St. telo}_o - \text{St. telo}_n: t(4,821) > t_{\text{crit}}(1,658), p < 0,05 (2,305e^{-06}).$$

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji (ΔC) neotvaranih uzoraka krvi živih osoba i autopsijskog materijala, dobijene su sledeće vrednosti:

$$\text{Krv}_a - \text{Krv}_z: t(1,703) > t_{\text{crit}}(1,662), p < 0,05 (0,046).$$

Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji (ΔC) otvaranih uzoraka krvi živih osoba i autopsijskog materijala, dobijene su sledeće vrednosti:

$$\text{Krv}_a - \text{Krv}_z: t(0,898) < t_{\text{crit}}(1,654), p > 0,05 (0,185).$$

6. DISKUSIJA

Poznavanje stabilnosti lekova, metabolita i u organizam egzogeno unetih supstanci u uzorcima bioloških tkiva je od velike važnosti u slučajevima kada se analitički rezultati evaluiraju i interpretiraju. Ovo je posebno značajno kada postoje zahtevi za ponavljanje analiza, bilo u svrhu procene kvaliteta same metode ili u cilju ocene prvobitnog rezultata, sa posebnim naglaskom na sudske postupke (205, 206). Nije retkost u forenzičkoj praksi da se postavi sumnja na nepravilnost uzorkovanja, analize ili čuvanja uzoraka, te se kao jedino rešenje nameće ponovljena analiza sačuvanih bioloških uzoraka.

U sudskomedicinskoj praksi, kada je u pitanju analiza alkoholemije, srećemo se sa uzorcima krvi poreklom od živih osoba, kao i sa uzorcima krvi i drugih bioloških uzoraka postmortalnog porekla. Analize rezultata ovog istraživanja trebalo bi posmatrati zasebno u odnosu na ova dva tipa uzoraka, pre svega imajući u vidu njihovo različito poreklo.

Pre same analize dobijenih rezultata neophodno je utvrditi preciznost analitičke metode kojom se ocenjuje vrednost koncentracije etanola nezavisno od tipa uzorka i vremena tokom kojeg se uzorci čuvaju. Imajući u vidu da je nepreciznost metode, tj. SD u funkciji inicijalne koncentracije metabolita – etanola (207-209), ona mora biti tumačena u skladu sa početnim koncentracijama. Prosečna vrednost nepreciznosti metode tokom ovog istraživanja bila je u rangu od 0,01 do 0,05 mg/ml, u rasponu koncentracija od 0,5 do 2,5 mg/ml, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima Jonesa i sar. (190), koji su naveli da pad vrednosti BEC, da bi se smatrao relevantnim, mora da iznosi iznad 0,013,

0,028 i 0,045 mg/ml pri početnim koncentracijama od 0,5, 1,5 i 2,5 mg/ml.

6.1. Analiza rezultata uzoraka krvi živih osoba

Pre svega neophodno je napomenuti jedan od potencijalno signifikantnih nedostataka ovog istraživanja, a to je nepostojanje kontrole nad uzorkovanjem krvi živih osoba, koje se prema postojećem Pravilniku odvija u zdravstvenoj ustanovi, ali u slučaju našeg istraživanja bez kontrole istraživača, što ima implikacije pre svega u vezi sa količinom uzorkovane krvi, pitanjem (ne)dodavanja konzervansa, neodređenom vremenskom periodu između uzorkovanja i dostavljanja uzorka laboratoriji, i nepoznate inicijalne temperature čuvanja uzoraka.

Tokom istraživanja deo ovih nedostataka smo pokušali da minimalizujemo isključivanjem iz istraživanja degradiranih i hemoliziranih uzoraka, te uključivanjem samo onih koji su imali procenat vazduha u epruveti od oko 20% (CA%) ili manje.

Etanol je isparljiva supstanca, i mnoga istraživanja su pokazala značajan pad koncentracije etanola ukoliko je narušen integritet vakutanera, ili je došlo do biološke degradacije zbog nedostatka konzervansa, npr. NaF (210). Upravo ovde nailazimo na još jedan veoma važan i potencijalno ograničavajući faktor u ovom istraživanju, a to je da se u rutinskom radu laboratorije Centra za sudsku medicinu KCV ne koristi fluorid kao konzervans. Kontaminacija uzoraka krvi gljivicama (*Candida Albicans*) ili bakterijama poreklom sa kože na mestu uzimanja uzorka može da vodi bilo u pravcu produkcije ili degradacije etanola u uzorku. Ovo je naročito važno kada su u pitanju postmortalni uzorci krvi, ili drugi biološki uzorci, s obzirom na to da su oni daleko češće kontaminirani bakterijama i gljivicama, jer putrefakcioni procesi

zapravo počinju neposredno nakon smrti iako su vidljivi tek posle određenog vremenskog perioda (172, 211, 212).

Tokom šestomesečnog čuvanja uzoraka krvi živih osoba na temperaturi od -18°C , bez ponovljenih otvaranja, na sto uzoraka prosečan pad koncentracije etanola iznosio je $0,115 \pm 0,091$ mg/ml (7,34% od inicijalne vrednosti), sa rasponom od 0,002 do 0,364 mg/ml. Ovo predstavlja statistički značajan pad koncentracije ($T > T_{\text{crit}}$, $p < 0,001$). Istom analizom sto uzoraka krvi, uz ponavljano otvaranje i analiziranje u drugom i četvrtom mesecu, prosečan pad koncentracije etanola iznosio je $0,229 \pm 0,159$ mg/ml (14,7% od početne vrednosti), u rasponu od 0,007 do 0,672 mg/ml. Poređenjem srednjih vrednosti razlika u koncentraciji otvaranih i neotvaranih uzoraka ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika gde je $t(6,17) > t_{\text{crit}}(1,652)$, $p < 0,001$ ($1.88537e^{-09}$).

Ovakvi rezultati su u skladu sa skorijim istraživanjima Jonesa i sar., koji su kao prosečan pad koncentracije etanola u neotvaranim uzorcima krvi dobili vrednost od $0,105 \pm 0,0686$ mg/ml, dok je kod otvaranih uzoraka ova vrednost tokom perioda od 6,5 meseci iznosila $0,217 \pm 0,054$ mg/ml (190). Jones i sar. su takođe pokazali da postoji korelacija između početnih vrednosti BEC i pada njegove vrednosti tokom šestomesečnog čuvanja. Naši rezultati su u skladu sa ovim istraživanjem, jer se prosečna vrednost pada koncentracije ΔC između inicijalne i analize nakon šest meseci kretala u rasponu od 0,033 mg/ml do 0,223 mg/ml kod neotvaranih uzoraka, tj. od 0,053 do 0,422 mg/ml kod otvaranih uzoraka.

Takođe, gubitak alkohola je u korelaciji ($r=0,44$, $p<0,001$) sa protokom vremena od inicijalne analize, iako postoji visok stepen varijabilnosti rezultata.

Svi navedeni rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa sličnim istraživanjima Jonesa i sar (190), kao i Ferrarija i sar (214), Wineka i sar. (213), Olsena i dr. (173). Sva ova ispitivanja su pokazala da je procenat promene alkoholemije kod uzoraka krvi živih osoba u funkciji dužine čuvanja, inicijalne BEC, temperature na kojoj se čuvaju uzorci, prisustva konzervansa i procenta vazduha CA% u vakutaneru u kojem se čuva etanol.

Namerno nismo poredili rezultate naših istraživanja sa onim gde je etanol čuvan na sobnoj temperaturi, ali je značajno uočiti da je u uzorcima pune krvi u ovakvim slučajevima, i bez prisustva konzervansa došlo do pada BEC 10-19% za 35 dana (213). .

Drugi autori poput Ferrarija i sar. (210, 214, 215) navode da ukoliko se uzorci krvi na pravilan način uzimaju od osoba, transportuju i čuvaju, prisustvo konzervansa i promena koncentracije etanola tokom vremena nije signifikantna. Posebno zanimljivo u istraživanju navedenih saradnika jesu ispitivanja BEC pri različitim vrednostima CA% od 0, 5, 20, 35 i 65%, a u svetlu da je etanol isparljiva supstanca i da odnos tečne i gasne faze u čuvanom uzorku može značajno da utiče na dobijene rezultate. Matematički model koji su oni u svom istraživanju dobili pokazuje da je prilikom čuvanja uzoraka u zamrznutom stanju i sa 0% CA% potrebno 909 dana da bi se koncentracija smanjila za pola, dok je sa CA% od 35% i pri temperaturi od 4°C za istu promenu neophodan samo 21 dan (210).

Naše istraživanje, kao i sva prethodno navedena istraživanja, ukazuju na neophodnost standardizacija uslova pri kojima se čuvaju uzorci etanola, pri čemu posebnu pažnju treba obratiti na temperaturu, CA%, i naravno na sve preanalitičke faktore koji bi mogli da imaju uticaj na pojačano isparavanje etanola ili njegovu konzumaciju od strane mikroorganizama.

6.2. Analiza rezultata bioloških uzoraka autopsijskog materijala

Kada je u pitanju analiza postmortalnih uzoraka, osim krvi analizirana je stabilnost etanola u uzorcima urina i staklastog tela.

Urin a naročito staklasto telo su uzorci koji su u manjem stepenu zahvaćeni uticajem bakterija i postmortalne kontaminacije, pre svega u odnosu na krv, i kao takvi ovi uzorci su teorijski podobni sa analizom imajući u vidu da su manje podložne postmortalnim promenama u odnosu na krv.

Analizom rezultata postmortalnih uzoraka ustanovljeno je da postoji statistički značajan pad koncentracije etanola u svim uzorcima, kako onim koji su ostali zatvoreni tokom šest meseci, tako i onih koji su bili otvarani.

Nije ustanovljeno postojanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti promena koncentracija krvi i urina, kao u neotvaranim tako i u otvaranim uzorcima. U obe grupe uzoraka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti promene koncentracije etanola u krvi i urinu sa jedne, i staklastog tela sa druge strane, kod kojeg je ujedno konstatovana i najmanja prosečna promena koncentracije u odnosu na ostale uzorke ($\bar{x} \Delta C$ 0,07 mg/ml kod zatvorenih i 0,134 mg/ml kod otvaranih uzoraka).

Ovo ukazuje na visoku stabilnost etanola u uzorcima staklastog tela, koja je samim tim prihvatljiva alternativa uzorkovanja kod postmortalnih uzoraka. Olsen i sar. čak navode da je u slučajevima potrebe za ponovljenom analizom postmortalnih uzoraka nakon dužeg vremenskog perioda čuvanja, staklasto telo pouzdaniji uzorak u odnosu na krv (173). Holmgren i sar. navode da se dodavanjem fluorida kao konzervansa i kod uzorka staklastog tela postiže značajno smanjenje promene koncentracije etanola u

zamrznutim uzorcima, bez obzira na inicijalnu hipotezu o odsustvu mikroorganizama u ovom biološkom uzorku (172). Isti autori navode zaključak da je staklasto telo podoban tkivni uzorak za analizu stabilnosti hemijskih supstanci, iako zaključke o odnosu između koncentracija u krvi u u staklastom telu treba uzeti sa izvesnom dozom rezerve.

Interesantno je da analizom promena koncentracije etanola u urinu nisu konstatovane statistički značajne razlike u odnosu na uzorke krvi, što je u saglasnosti i sa drugim istraživanjima na ovu temu (216).

Poređenjem srednjih vrednosti promena koncentracija etanola u krvi, urinu i staklastom telu između otvorenih i zatvorenih uzoraka, ustanovljeno je da postoje statistički značajne razlike jer su prosečne vrednosti promene koncentracije kod otvorenih uzoraka bile značajno veće u odnosu na zatvorene.

Finalni deo diskusije odnosi se na analizu, tj. poređenje prosečnih vrednosti promene koncentracije etanola u uzorcima krvi između živih osoba i lešnog materija, kod zatvorenih i kod otvaranih uzoraka. Konstatovano je da između vrednosti kod zatvorenih uzoraka postoji statistički značajna razlika, tj srednja vrednost promene koncentracija bila je značajno veća kod autopsijskih uzoraka krvi, dok ovakav odnos nije konstatovan kod otvaranih uzoraka, gde nije ustanovljeno postojanje značajnih razlika u dobijenim srednjim vrednostima.

Kada bismo pokušali da sumiramo sve navedene rezultate i njihov značaj u odnosu na postavljene ciljeve istraživanja, kao i poređenjem sa rezultatima drugih studija na sličnu temu, moglo bi se navesti sledeće:

- U procesu analize bioloških uzoraka daleko manje pažnje se posvećuje brojnim preanalitičkim faktorima rizika kao što su način

uzimanja uzoraka, veličina epruvete i međusobni zapreminski odnos telesnih tečnosti i vazduha (CA%), količina i tip konzervansa koji se upotrebljava, temperatura i uslovi čuvanja uzorka pre same analize, ali i nakon nje (217, 218). Ovi faktori su u literaturi mnogo manje analizirani u odnosu na analitičke faktore poput senzitivnosti, specifičnosti, preciznosti i linearnosti upotrebljene metode.

- Etanol je isparljiva supstanca, te je očekivano da dođe do smanjenja koncentracije etanola u biološkim uzorcima, pre svega u slučajevima kada postoji propust prilikom zatvaranja uzoraka koji se stavljaju na čuvanje, ili kada nije dodat konzervans u uzorak (210). Degradacija ili čak sinteza etanola od strane mikroorganizama je naročit problem kod postmortalnih uzoraka, jer su oni mnogo češće kontaminirani bakterijama ili gljivicama (172, 190, 212).

- Prilikom interpretacije rezultata neophodno je imati u vidu vrednosti SD, tj. nepreciznost same metode. Zbog toga što je preciznost u funkciji promene koncentracija, ove razlike se moraju uzimati u obzir na različitim nivoima BEC. Iako su mnoga istraživanja, kao i ovo, pokazala da je promena koncentracije etanola u biološkim uzorcima pre svega u funkciji vremena čuvanja uzoraka, zbog visoke SD nije preporučljivo donošenje bilo kakvih procena o prvobitnoj koncentraciji etanola regresionom analizom (190)

- Ponavljano otvaranje epruveta za analizu etanola rezultuje u njegovom većem gubitku istog iz prvobitnog uzorka. Uzrok treba tražiti pre svega u ventilaciji prilikom kontakta tečne sa gasnom fazom - sa vazduhom okoline, dok su neki istraživači ukazali na mogućnost neenzimatske oksidativne reakcije putem oksihemoglobina iz eritrocita. U odnosu na ovaj navod, moglo bi se očekivati da velike varijacije u uzorcima mogu da vode poreklo od

različitog sadržaja karboksihemoglobina u krvi, pre svega kod pušača (219).

- Smanjenje koncentracije etanola isparavanjem prilikom otvaranja epruveta za analizu, čime bi se mogao objasniti veći pad koncentracije kod otvaranih uzoraka, mnogi autori osporavaju kao ubedljivo objašnjenje. Naime, na sobnoj temperaturi odnos etanola u krvi i vazduhu je 5000:1, te je količina etanola koja prelazi u isparljivu fazu zanemarljiva u odnosu na onu u tečnoj sredini (220). Oksidativni enzimi, poput alkoholoksidaze ili dehidrogenaze su locirani pre svega u jetri, a ne u krvi (221). Jones i sar. su eksperimentalno ukazali na to da tokom vremena koncentracija etanola u plazmi opada značajno manje u odnosu na krv, što, kako je prethodno navedeno, upućuje na značaj enzimske aktivnosti u eritrocitima koja uzrokuje pad alkoholemije (190)

- Imajući u vidu prethodno navedeno, očekivano je da postoji statistički značajna razlika između promene koncentracije etanola u urinu i krvi. Naše istraživanje je pak pokazalo suprotno, što upućuje na značaj dodavanja fluorida kao konzervansa, o čemu postoje slični podaci u literaturi (222). Isto se odnosi i na promene koncentracije etanola u staklastom telu u odnosu na krv i urin, s tim da se radi o sredini koja je praktično izolovana od delovanja mikroorganizama, te je promena koncentracije u ovim uzorcima i značajno manja u odnosu na krv i urin.

- Naposljetku, može se reći da je promena koncentracije etanola u biološkim uzorcima u funkciji vrste uzorka o kojem se radi (krv, mokraća, staklasto telo, žive osobe, lešni materijal), početne BEC, dužine čuvanja uzoraka, prisustva/odsustva konzervansa, temperature čuvanja uzorka i odnosa tečne i gasne faze u vijalima za čuvanje uzoraka. Naravno, prilikom tumačenja značajnosti promene koncentracija, uvek treba uzeti u obzir i značaj nepreciznosti metode, te tek ukoliko promena koncentracije uzorka prevazilazi prag nepreciznosti koji je u funkciji početne BEC,

moguće je, uz dozu opreza, donositi zaključke o značajnosti promene koncentracije etanola u biološkim uzorcima.

7. ZAKLJUČCI

U radu je analizirana stabilnost etanola tokom perioda čuvanja od šest meseci, u uzorcima krvi živih osoba, kao i u uzorcima krvi, urina i staklastog tela sa autopsijskog materijala.

U odnosu na hipoteze i ciljeve istraživanja, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Tokom čuvanja bioloških uzoraka u periodu od šest meseci ustanovljeno je da je došlo do značajnog smanjenja koncentracije etanola u svim analiziranim uzorcima, nezavisno od njegovog porekla.
2. Promena koncentracije zavisi od početnog nivoa alkoholemije, tj. što je alkoholemija prilikom inicijalne analize veća, to je pad koncentracije nakon šest meseci izraženiji.
3. Ne postoji značajna razlika između promene koncentracije etanola u uzorcima krvi i urina sa lešnog materijala, ali postoji značajna razlika između promena koncentracije etanola u krvi i urinu, tj u staklastom telu, gde je kako kod otvaranih, tako i kod zatvorenih uzoraka došlo do najmanjeg pada alkoholemije u navedenom periodu čuvanja.
4. Kod otvaranih uzoraka, nezavisno od porekla, dolazi do većeg i statistički značajnog smanjenja koncentracije etanola u odnosu na neotvarane uzorke.
5. Na osnovu ovog istraživanja ne može se doneti jasan zaključak o tome da li postoji značajna razlika u promeni

koncentracije etanola kod uzoraka krvi živih osoba i sa lešnog materijala, kako kod zatvorenih, tako i kod otvaranih uzoraka.

6. Od uzoraka tkiva sa autopsijskog materijala, prema očekivanju, najveću stabilnost imaju uzorci staklastog tela, kod kojih je zabeležena najmanja promena koncentracije ali se, bez obzira na navedeno, zbog velike standardne devijacije ne preporučuje korišćenje ovih koncentracija za preračun inicijalne alkoholemije.
7. Promena koncentracije etanola tokom čuvanja u zavisnosti je od tkivne vrste uzorka, inicijalne alkoholemije, dužine čuvanja, integriteta viala i čepova, temperature, odnosa tečne i gasne faze, prisustva konzervansa i potencijalnog intermitentnog otvaranja radi analiza.
8. Dva osnovna nedostatka ovog istraživanja su nemogućnost kontrole nad inicijalnim uzorkovanjem krvi kod živih osoba, i nedodavanje fluorida kao važnog konzervansa, koji sprečava aktivnost mikroorganizama i ne dozvoljava značajnu promenu koncentracije etanola u uzorcima, te je preporuka da se prilikom konzerviranja uzoraka u dužem vremenskom periodu dodaje konzervans čime bi se sprečile nedoumice u vezi sa poreklom promene koncentracije etanola.
9. Prilikom ponavljanja analiza neophodno je imati u vidu prosečnu grešku analitičke metode a koja je u zavisnosti od vrednosti inicijalne alkoholemije.

8. LITERATURA

1. Freimuth CH. Forensic aspects of alcohol (chapter XX). In: Spitz WU, ed. *Medicolegal investigation of death*. Springfield, Illinois: Charles C Thomas Publisher 1993. p. 767-775.
2. Varagić V, Milošević M. *Farmakologija*. Beograd: Elit Medica; 2003.
3. Simić M. Sudskomedicinski aspekti alkoholisanosti (poglavlje 9). u Tasić M, i sar. *Sudska medicina*. Novi Sad: Zmaj; 2007. p. 157-175.
4. Clark JC. Sudden death in the chronic alcoholic. *Forensic Sci Int*. 1988;36:105–111.
5. Hansen AU, Simonsen U. The manner and cause of death in a forensic series of chronic alcoholics. *Forensic Sci Int*. 1991;49:171–178.
6. Crombie IK, Pounder DJ, Dick PH. Who takes alcohol prior to suicide?. *J Clin. Forensic Med*. 1998;5:65–68.
7. Bilban M, Skibin L. Presence of alcohol in suicide victims. *Forensic Sci Int*. 2005;147 Suppl:9–12.
8. Jonsson A, Holmgren P, Ahlner J. Fatal intoxications in a Swedish forensic autopsy material during 1992–2002. *Forensic Sci. Int*. 2004;143:53–59.
9. Borges G, Cherpitel CJ, MacDonald S, Giesbrecht N, Stockwell T, Wilcox HC. A case-crossover study of acute alcohol use and suicide attempt. *J Stud Alcohol*. 2004;65:708–714.
10. Cox DE, Sadler DW, Pounder DJ. Alcohol estimation at necropsy: epidemiology, economics, and the elderly. *J Clin Pathol*. 1997;50:197–201.
11. Sjogren H, Eriksson A, Ahlm K. Role of alcohol in unnatural deaths: a study of all deaths in Sweden. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:1050–1056.

12. Perola M, Vuori E, Penttila A. Abuse of alcohol in sudden out-of hospital deaths in Finland. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18:255–260.
13. Girasek DC, Gielen AC, Smith GS. Alcohol's contribution to fatal injuries: a report on public perceptions. *Ann Emerg Med.* 2002;39:622–630.
14. Carpenter JA. Effects of alcohol on some psychological processes. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol.* 1980;23:274.
15. Levine JM, Kramer J, Levine E. Effects of alcohol on human performance. *Journal of Applied Psychology.* 1975;60:508.
16. Finnigan F, Hammersley R. The effects of alcohol on performance. In Smith A, Jones D. ed. *Handbook of Human Performance Volume 2.* Orlando FL: Academic Press Ltd 1992. p. 73.
17. Goldberg, L. Quantitative studies on alcohol tolerance in man. the influence of ethyl alcohol on sensory, motor, and psychological functions referred to blood alcohol in normal and habituated individuals. *Acta Physiol Scand.* 1943;5 Suppl 16:1.
18. Baylor AM, Layne CS, Mayfield RD, Osborne L, Spirduso WW. Effects of ethanol on human fractionated response times. *Drug and Alcohol Dependence.* 1989;23:31.
19. Taberner PV. Sex differences in the effects of low doses of ethanol on human reaction time. *Psychopharmacology.* 1980;70:283.
20. Maylor EA, Rabbitt PM, James GH, Kerr SA. Effects of alcohol and extended practice on divided-attention performance. *Perception and Psychophysics.* 1990;48:445.
21. Linnoila M, Erwin CW, Ramm D, Cleveland WP. Effects of age and alcohol on psychomotor performance of men. *Journal of Studies on Alcohol.* 1980;41:488.

22. Fagan D, Tiplady B, Scott DB. Effects of ethanol on psychomotor performance. *British Journal of Anaesthesia*. 1987;59:961.
23. Golby, J. Use of factor analysis in the study of alcohol-induced strategy changes in skilled performance on a soccer test. *Perceptual and Motor Skills*. 1989;68:147.
24. Connors GJ, Maisto, SA. Effects of alcohol instructions and consumption rate on motor performance. *Journal of Studies on Alcohol*. 1980;41:509.
25. Maylor EA, Rabbitt PM, Connolly SA. Rate of processing and judgment of response speed: comparing the effects of alcohol and practice. *Perception and Psychophysics*. 1989;45:431.
26. Moskowitz H, Burns MM, Williams AF. Skilled performance at low blood alcohol levels. *Journal of Studies on Alcohol*. 1985;46:482Ko vidi .
27. Zador PL. Alcohol-related relative risk of fatal driver injuries in relation to driver age and sex. *Journal of Studies on Alcohol*. 1991;52:302.
28. Hindmarch I, Bhatti JZ, Starmer GA, Mascord DJ, Kerr JS, Sherwood N. The effects of alcohol on the cognitive function of males and females and on skills relating to car driving. *Human Psychopharmacology*. 1992;7:105.
29. Sobell LC, Sobell MB, Coleman RF. Alcohol-induced dysfluency in nonalcoholics. *Folia Phoniatrica*. 1982;34:316.
30. Lester L, Skousen R. The phonology of drunkenness. In *Papers from the Parasession on Natural Phonology*. Bruck A, Fox RA, LaGay MW. eds. Chicago: Chicago Linguistic Society. 1974; 8.
31. Nito Y, Johnson WH, Money KE. The non-auditory labyrinth and positional alcohol nystagmus. *Acta Otolaryngology*. 1964;58:65.

32. Aschan G, Gergstedt M. Positional alcoholic nystagmus (PAN) in man following repeated alcohol doses. *Acta Otolaryngology*. 1975;330 Suppl:15.
33. Iurato S. *Submicroscopic Structure of the Inner Ear*. Pergamon Press;1967:216.
34. Tharp VK, Burns M, Moskowitz H. Development and field test of psychophysical tests for DWI arrest: final report. Technical report DOT-HS-805-864, Washington D.C. National Highway Traffic Safety Administration 1981.
35. Lipscomb TR, Nathan PE. Effect of family history of alcoholism, drinking pattern, and tolerance on blood alcohol level discrimination. *Archives of General Psychiatry*. 1980;37:576.
36. Goldstein DB. *Pharmacology of Alcohol*. New York: Oxford University Press; 1983.
37. Frezza M, DiPadova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber C. High blood alcohol levels in women: the role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. *New England Journal of Medicine*. 1990;322:95.
38. Sutker PB, Allain AN, Brantley PS, Randall CL. Acute alcohol intoxication, negative affect, and autonomic arousal in women and men. *Addictive Behaviors*. 1982;7:17.
39. Jones MK, Jones BM. The relationship of age and drinking habits to the effects of alcohol on memory in women. *Journal of Studies on Alcohol*. 1980;41:179.
40. Vogel-Sprott M, Barrett P. Age, drinking habits, and the effects of alcohol. *Journal of Studies on Alcohol*. 1984;45:517.
41. Martin CS, Earleywine M, Musty RE, Perrine MW, Swift RM. Development and validation of the biphasic alcohol effects

- scale. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1993;17:140.
42. DeWit H, Uhlenhuth E, Pierrri J, Johanson C. Individual differences in behavioral and subjective responses to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1987;11:52.
43. Martin CS, Earleywine M. Ascending and descending rates of change of blood alcohol concentrations and subjective intoxication ratings. *Journal of Substance Abuse*. 1990;2:345.
44. Kelly M, Myrsten AL, Neri A, Rydberg U. Effects and after-effects of alcohol on psychological and physiological functions in man — a controlled study. *Blutalkohol*. 1970;7:422.
45. Collins WE, Chiles WD. Laboratory performance during acute alcohol intoxication and hangover. *Human Factors*. 1980;22:445.
46. Perrine MW, Foss RD, Meyers AR, Voas RB, Velez C. Field sobriety tests: reliability and validity. In Utelmann, Berghaus, Kroj, eds. *Alcohol, Drugs and Traffic Safety*. Cologne Germany: Verlag TUV Rheinland 1993.
47. Jones AW. Biochemistry and physiology of alcohol: Applications to forensic science and toxicology. Chapter 4 in Garriott J ed. *Medicolegal aspects of alcohol*. Tuson: Lawyers & Judges Publishing Co. 1996.
48. Gentry RT, Baraona E, Livber CS. Gastric first pass metabolism of alcohol. *J Lab Clin Med* 1994;123:21.
49. Fressa M, DiPadova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women: the role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. *N Eng J Med* 1990;322:95.
50. Widmark EMP. Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen.

Alkoholbestimmung. Berlin: Urban und Schwarzenberg. 1932:1- 140

51. Andreasson R, Jones AW. The life and work of Erik MP Widmark. *Am J Forens Med Pathol.* 1996;17:177.
52. Millar K, Hammersley RH, Finnigan F. Reduction of alcohol-induced performance by prior ingestion of food. *Br J Psychol.* 1992;83:261.
53. Jones AW, Jonsson K. Food-induced lowering of blood ethanol profiles and increased rate of elimination immediately after a meal. *J Forens Sci.* 1994;39:1084.
54. Jones AW. Interindividual variations in the disposition and metabolism of ethanol in healthy men. *Alcohol* 1984;1:385.
55. Jones AW. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects; implications in forensic toxicology. *J Forens Sci.* 1993;38:104.
56. Jones AW. Pharmacokinetics of ethanol in saliva; Comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication and diminished performance. *Clin Chem.* 1993;39:1837.
57. Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl Glucuronide: An unusual ethanol metabolite in humans, synthesis, analytical data. *J Anal Tox.* 1995;19:91.
58. Ammon E, Schäfer C, Hofmann U, Klotz U. Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans: Is it gastric or hepatic and does it depend on gender. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59:503.
59. Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmac Ther.* 1995;68:385.
60. Teschke P, Gellert J. Hepatic microsomal ethanol oxidizing systems (MEOS): Metabolic aspects and clinical implications. *Alcoholism Clin Exp Res.* 1986;10:20.

61. Lieber CS. Mechanisms of ethanol induced hepatic injury. *Pharmac Ther.* 1990;46:1.
62. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Eng J Med.* 1995;333:1118.
63. Hu Y, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO. Inductive mechanisms of cytochrome P4502E1 in liver: Interplay between ethanol treatment and starvation. *Biochem Pharmacol* 50,155,1995.
64. Slattery JT, Nelson SD, Thummel KE. The complex interaction between ethanol and acetaminophen. *Clin Pharm Ther.* 1996;60:241.
65. Ahmed FE. Toxicological effects of ethanol on human health. *Crit Rev Toxicol.* 1995;25:347.
66. Jones AW. Forensic Science aspects of ethanol metabolism. In Mahley A ed: *Forensic Science Progress.* Williams: Springer Verlag, 1991..
67. Jones AW, Andersson L. Influence of age, gender, and blood-alcohol concentration on rate of alcohol elimination from blood in drinking drivers. *J Forens Sci.* 1996;41:922.
68. Jones AW, Sternebring B. Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alc Alcohol.* 1992;27:647.
69. Keiding S, Christensen NJ, Damgaard SE, Dejgrd A, et al. Ethanol metabolism in heavy drinkers after massive and moderate alcohol intake. *Biochem Pharmacol.* 1983;20:3097.
70. Lötterle J, Husslein EM, Bolt J, Wirtz PM. Tageszeitliche Unterschiede der Alkoholresorption. *Blutalkohol.* 1989;26:369.
71. Johnson RD, Horowitz M, Maddox AF, Wishart JM, Shearman DJC. Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *Br Med J.* 1991;302:20.

72. Jones AW, Hahn R, Stalberg HP. Pharmacokinetics of ethanol in plasma and whole blood; Estimation of total body water by the dilution principle. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;42:445.
73. Gullberg RG, Jones AW. Guidelines for estimating the amount of alcohol consumed from a single measurement of blood alcohol concentration; re-evaluation of Widmark's equation. *Forens Sci Int.* 1994;69:119.
74. Fraser AG, Rosalki SB, Gamble GD, Pounder RE. Inter-individual and intraindividual variability of ethanol concentration-time profiles: comparison of ethanol ingestion before or after an evening meal. *Br J Clin Pharmacol.* 1995;40:387.
75. Jones AW, Jönsson K. Between subject and within subject variations in the pharmacokinetics of ethanol. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;37:427.
76. Al-Lanqawi Y, Moreland TA, McEwen J, Halliday F, Durnin CJ, Stevenson IH. Ethanol kinetics: extent of error in back extrapolation procedures. *Br J Clin Pharmacol.* 1992;34:316.
77. Millar K, Hammersley RH, Finnigan F. Reduction of alcohol-induced performance by prior ingestion of food. *Br J Psychol.* 1992;83:261.
78. Jackson PR, Tucker GT, Woods HF. Backtracking booze with Bayes - the retrospective interpretation of blood alcohol data. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;31:55.
79. Wagner JG, Wilkinson PK, Ganes DA. Estimation of the amount of alcohol ingested from a single blood alcohol concentration. *Alc Alcohol.* 1990;25:379.
80. Fujimiya T, Uemura K, Ohbora Y, Komura S. Problems in pharmacokinetic analysis of alcohol disposition: A trial of the Bayesian Least-Squares method. *Alcoholism Clin Exp Res.* 1996;20:2A.

81. Komura S, Fujimiya T, Yoshimoto K. Fundamental studies on alcohol dependence and disposition. *Forens Sci Intern.* 1996;80:99.
82. Smith GD, Shaw LJ, Maini PK, Ward RJ, Peters TJ, Murray JD. Mathematical modelling of ethanol metabolism in normal subjects and chronic alcohol misusers. *Alc Alcohol.* 1993;28:25.
83. Pieters JE, Wedel M, Schaafsma G. Parameter estimation in a three-compartment model for blood alcohol curves. *Alc Alcohol.* 1990;25:17.
84. Hahn RG, Norberg Å, Gabrielsson J, Danielsson A, Jones AW. Eating a meal increases the clearance of ethanol given by intravenous infusion. *Alc Alcohol.* 1994;29:673.
85. Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol "Auto brewery Syndrome" as a drunk-driving defence challenge. *Med Sci Law.* 2000;40:205.
86. Jones AW. Measuring alcohol in blood and breath for forensic purposes - A historical review. *Forensic Sci Rev.* 1996;8:13.
87. Jones AW. Medicolegal alcohol determinations – breath or blood alcohol concentrations? *Forensic Sci Rev.* 2000;12:23.
88. Službeni glasnik Republike Srbije, 41/2009. Beograd. JP "Službeni glasnik".
89. Službeni glasnik Republike Srbije, 53/2009. Beograd. JP "Službeni glasnik".
90. Službeni glasnik Republike Srbije, 101/2011. Beograd. JP "Službeni glasnik".
91. Službeni glasnik Republike Srbije, 32/2013. Beograd. JP "Službeni glasnik".
92. Službeni glasnik Republike Srbije, 55/2014. Beograd. JP "Službeni glasnik".
93. Službeni glasnik Republike Srbije, 96/2015. Beograd. JP "Službeni glasnik"

94. Kelly DF. Alcohol and head injury, an issue revisited. *J Neurotrauma* 1995;12: 883.
95. Jacobsen O, McMartin KE. Methanol and ethylene glycol poisoning; mechanisms of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. *Med Toxicol.* 1986;1:309.
96. Jones AW, Schuberth JO. Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis; Importance of on-line process control. *J Forens Sci.* 1989;34:1116.
97. Fraser CG. Interpretation of clinical chemistry laboratory data. Blackwell Scientific Publications. 1986.
98. Frajola WJ. Blood alcohol testing in the clinical laboratory: Problems and suggested remedies. *Clin Chem.* 1993;39:377.
99. Charlebois RC, Corbett MR, Wigmore JG. Comparison of ethanol concentrations in blood, serum, and blood cells for forensic applications. *J Anal Toxicol.* 1996;20:171.
100. Rainey PM. Relation between serum and whole blood ethanol concentrations. *Clin Chem.* 1993;39:2288.
101. Vasilliades J, Pollock J, Robinson A. Pitfalls of the alcohol dehydrogenase procedure for the emergency assay of alcohol: A case study if isopropanol overdose. *Clin Chem.* 1978;24:383.
102. Nine JS, Moraca M, Virji MA, Rao KN. Serum-ethanol determination: Comparison of lactate and lactate dehydrogenase interference in three enzymatic assays. *J Anal Toxicol.* 1995;19:192.
103. De Martinis BS, Martin CC. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. *Forensic Sci Int.* 2002;128:115.

104. Christmore DS, Kelly RC, Doshier LA. Improved recovery and stability of ethanol in automated headspace analysis. *J Forensic Sci.* 1984;29:1038-1044.
105. Watts MT, McDonald OL. The effect of biologic specimen type on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. *Am J Clin Pathol.* 1987;87:79-85.
106. Strassnig S, Lankmayr EP. Elimination of matrix effects for static headspace analysis of ethanol. *J Chromatogr.* 1999;849:629-636.
107. Watts MT, McDonald OL. The effect of sodium chloride concentration, water content, and protein on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol in plasma. *Am J Clin Pathol.* 1990;93:357-362.
108. O'Neal CL, Wolf CE, Levine B, Kunsman G, Poklis A. Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Sci Int.* 1996;83:31-38.
109. Fung WK, Chan KL, Mok VK, Lee CW, Choi WM. The statistical variability of blood alcohol concentration measurements in drink-driving cases. *Forensic Sci Int.* 2000;110:207-214.
110. Sylvester PA, Wong NA, Warren BF, Ranson DL. Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *J Clin Pathol.* 1998;51:250-252.
111. Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. *Clin Chem.* 1983;29:5.
112. Phillips M. Breath tests in medicine. *Sci Am.* 1992;270:52.
113. Dubowski KM, Caplan Y. Alcohol testing in the workplace. Chapter 19 in Garriott J ed: *Medicolegal aspects*

- of alcohol. Tuson, Lawyers & Judges Publishing Co.: 1996: 439.
114. Falkensson M, Jones AW, Sörbö B. Bedside diagnosis of alcohol intoxication with a pocket-size breath-alcohol device sampling from unconscious subjects and specificity for ethanol. *Clin Chem.* 1989;35:918.
 115. Frank JF, Flores AL. The likelihood of acetone interference in breath alcohol measurement. *Alcohol, Drugs, and Driving.* 1987;3:1.
 116. Dubowski KM. The technology of breath-alcohol analysis. US Dept of Health and Human Services, 1992;DHHS Publication No (ADM) 92-1728.
 117. Dubowski KM. Quality assurance in breath-alcohol analysis. *J Anal Toxicol.* 1994;18:306.
 118. Emerson VJ, Holleyhead R, Isaacs DJ, Fuller NA, Hunt DJ. The measurement of breath alcohol. *J For Sci Soc.* 1980;20:1.
 119. Riley D, Wigmore JG, Yen B. Dilution of blood collected for medicolegal alcohol analysis by intravenous fluids. *J Analyt Tox.* 1996;20:330.
 120. Meyer T, Monge PK, Sakshaug J. Storage of blood samples containing alcohol. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1979;45:282.
 121. Jones AW, Edman-Falkensson M, Nilsson L. Reliability of blood alcohol determinations at clinical chemistry laboratories in Sweden. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995;35:463.
 122. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. *Toxicol Rev.* 2005;24:51–62.

123. Leikin JB, Watson WA. Post-mortem toxicology: what the dead can and cannot tell us. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2003;41:47–56.
124. O’Neal CL, Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review. *Am J Forensic Med.Pathol.* 1996;17:8–20.
125. Petković S. Eksperimentalni pristup problematici postmortalne difuzije i produkcije etanola u sudskomedicinskoj praksi .Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Novi Sad, 2008.
126. Yarema MC, Becker CE. Key concepts in postmortem drug redistribution. *Clin Toxicol.* 2005;43:235–241.
127. Sjovall E, Widmark EMP, Alkoholbestamning vid rattsmedicinska obduktioner. *Lunds universitets arsskrift.* 1930:2;1–30.
128. Wolthers H. Undersøgelser over Postmortal Alkoholdannelse. Copenhagen. Christtreus Bogtrykkeri: 1958: 1–79 pp.
129. Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicol Rev.* 2005;24:63–71.
130. Druid P, Holmgren A. Compilation of fatal and control concentrations of drugs in postmortem femoral blood. *J Forensic Sci.* 1997;42:79–87.
131. Harper DR, Corry JE. Collection and storage of specimens for alcohol analysis, in: Garriott JC Ed. *Medicolegal Aspects of Alcohol Determination in Biological Specimens.* Tuscon, Lawyers & Judges Publishing Company: 1988: 145–169.
132. Yajima D, Motani H, Kamei K, Sato Y, Hayakawa M, Iwase H. Ethanol production by *Candida albicans* in

- postmortem human blood samples: effects of blood glucose level and dilution. *Forensic Sci Int.* 2006;164:116–121.
133. Plueckhahn VD. The evaluation of autopsy blood alcohol levels. *Med Sci Law.* 1968;8:168–176.
134. Jones AW, Andersson R, Sakshaug J, Mørland J. Possible formation of ethanol in postmortem blood specimens after antemortem treatment with mannitol. *J Anal Toxicol.* 1991;15:157–158.
135. Singer PP, Jones GR. Very unusual ethanol distribution in a fatality. *J Anal Toxicol.* 1997;21:506–508.
136. Malingre M, Ververs T, Bos S, Van Kesteren C, Van Rijn H. Alcohol swabs and venipuncture in a routine hospital setting: no effect on blood ethanol measurement. *Ther Drug Monit.* 2005;27:403–404.
137. Jones AW, Rajs J. Appreciable blood-ethanol concentration after washing abraded and lacerated skin with surgical spirit. *J Anal Toxicol.* 1997;21:587–588.
138. Sylvester PA, Wong NA, Warren BF, Ranson DL. Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *J Clin Pathol.* 1998;51:250–252.
139. Budd RD. Validity of post mortem chest cavity blood ethanol determinations. *J Chromatogr.* 1988;449:337–340.
140. Jones AW, Holmgren P. Comparison of blood-ethanol concentration in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *J Forensic Sci.* 2003;48:874–879.
141. Koski A, Ojanpera I, Vuori E. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings. *Hum Exp Toxicol.* 2003;22:281–287.
142. Vuori E, Renkonen OV, Lindbohm R. Validity of post mortem blood alcohol values. *Lancet* 1983;1:761–762.

143. Heatley MK, Crane J. The blood alcohol concentration at post-mortem in 175 fatal cases of alcohol intoxication. *Med Sci Law*. 1990;30:101–105.
144. Poikolainen K. Estimated lethal ethanol concentrations in relation to age, aspiration, and drugs. *Alcohol Clin Exp Res*. 1984;8:223–225.
145. Padosch SA, Schmidt PH, Kroner LU, Madea B. Death due to positional asphyxia under severe alcoholisation: pathophysiologic and forensic considerations. *Forensic Sci Int*. 2005;149:67–73.
146. Buchsbaum RM, Adelson L, Sunshine I. A comparison of postmortem ethanol levels obtained from blood and subdural specimens. *Forensic Sci Int*. 1989;41:237–243.
147. Takahashi K, Ikeda N, Kudo K, Ohtsuka Y. Ethanol distribution in the brain of a victim autopsied after acute subdural hemorrhage. *Leg Med*. 1999;1:111–113.
148. Smialek JE, Spitz WU, Wolfe JA. Ethanol in intracerebral clot. Report of two homicidal cases with prolonged survival after injury. *Am J Forensic Med Pathol*. 1980;1:149–150.
149. Felby S, Nielsen E. Postmortem blood alcohol concentration. *Blutalkohol*. 1993;30:244–250.
150. Brettel HF. Der Korrekturfaktor bei der gaschromatographischen Leichenblutalkoholbestimmung. *Blutalkohol*. 1973;10:120–124.
151. Heatley MK, Crane J. The relationship between blood and urine alcohol concentrations at autopsy. *Med Sci Law*. 1989;29:209–217.
152. Jones AW. Reference limits for urine/blood ratios of ethanol in two successive voids from drinking drivers. *J Anal Toxicol*. 2002;26:333–339.
153. Jones AW. Ethanol distribution ratios between urine and capillary blood in controlled experiments and in

- apprehended drinking drivers. *J Forensic Sci.* 1992;37:21–34.
154. Jones AW, Holmgren P. Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *Forensic Sci Int.* 2003;135:206–212.
155. Winek CL. Reliability of 22-h postmortem blood and gastric alcohol samples (letter to the editor). *JAMA.* 1975;233:912.
156. Collison IB. Elevated postmortem ethanol concentrations in an insulin dependent diabetic. *J Anal Toxicol.* 2005;29:762–764.
157. Jones AW, Hysten E, Svensson A, Helander E. Storage of specimens at +4 degrees C or addition of sodium fluoride (1%) prevents formation of ethanol in urine inoculated with *Candida albicans*. *J Anal Toxicol.* 1999;23:333–336.
158. Gruszecki AC, Robinson CA, Kloda S, Brissie RM. High urine ethanol and negative blood and vitreous ethanol in a diabetic woman: a case report, retrospective case survey, and review of the literature. *Am J Forensic Med Pathol.* 2005;26:96–98.
159. Moritz AR, Jetter WW. Antemortem and postmortem diffusion of alcohol through the mucosa of the bladder. *Arch Pathol.* 1942;33:939–948.
160. Winek CL, Murphy KL, Winek TA. The unreliability of using a urine ethanol concentration to predict a blood ethanol concentration. *Forensic Sci Int.* 1984;25:277–281.
161. Sturner WQ, Coumbis RJ. The quantitation of ethyl alcohol in vitreous humor and blood by gas chromatography. *Am J Clin Pathol.* 1966;46:349–351.
162. Kraut A. Vitreous alcohol. *Forensic Sci Int.* 1995;73:157–158.

163. Yip DCP. Vitreous humor alcohol. *Forensic Sci Int.* 1995;73:155.
164. Chao TC, Lo DST. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels. *Am J Forensic Med Pathol.* 1993;14:303–308.
165. Pecllet C, Picotte P, Jobin F. The use of vitreous humor levels of glucose, lactic acid and blood levels of acetone to establish antemortem hyperglycemia in diabetics. *Forensic Sci Int.* 1994;65:1–6.
166. Mulla A, Massey KL, Kalra J. Vitreous humor biochemical constituents: evaluation of between-eye differences. *Am J Forensic Med Pathol.* 2005;26:146–149.
167. Harper DR. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci Int.* 1989;43:37–44.
168. Schwar TG. Intraocular post-mortem glucose concentrations and alcohol production. *Blutalkohol.* 1982;19:490–496.
169. Jones AW, Holmgren P. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J Clin Pathol.* 2001;54:699–702.
170. Honey D, Caylor C, Luthi R, Kerrigan S. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *J Anal Toxicol.* 2005;29:365–369.
171. Fernandez P, Lopez-Rivadulla M, Linares JM, Tato F, Bermejo AM. A comparative pharmacokinetic study of ethanol in the blood, vitreous humour and aqueous humour of rabbits. *Forensic Sci Int.* 1989;41:61–65.
172. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *J Forensic Sci.* 2004;49:820–825.

173. Olsen T, Hearn WL. Stability of ethanol in postmortem blood and vitreous humor in long-term refrigerated storage. *J Anal Toxicol.* 2003;27:517–519.
174. Parsons MA, Start RD, Forrest ARW. Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humor biochemistry and toxicology. *J Clin Pathol.* 2003;56:720.
175. Kuroda N, Kita T, Sannohe S. Medicolegal significance of the differences in ethanol concentrations of body fluids. *Hirosaki Med J.* 1999;51:S6–S9.
176. Ohshima T, Kondo T, Sato Y, Takayasu T. Postmortem alcohol analysis of the synovial fluid and its availability in medico-legal practices. *Forensic Sci Int.* 1997;90:131–138.
177. Kyriacou E, Busuttil A. Post-mortem values of biliary ethanol. A comparative study with levels in other body fluids. *Rom J Leg Med.* 1997;5:221–228.
178. Budd RD. Ethanol levels in postmortem body fluids. *J Chromatogr.* 1982;252:315–318.
179. Trela F, Bogusz M. Usefulness of ethanol determination in perilymph and skeletal muscle in the case of advanced putrefaction of the body. *Blutalkohol.* 1980;17:198–206.
180. Grellner W, Iffland R. Assessment of postmortem blood alcohol concentrations by ethanol levels measured in fluids from putrefactive blisters. *Forensic Sci Int.* 1997;90:57–63.
181. Winek CL, Esposito FM. Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Sci Int.* 1981;17:27–36.
182. Jenkins AJ, Levine BS, Smialek JE. Distribution of ethanol in postmortem liver. *J Forensic Sci.* 1995;40:611–613.
183. Garriott JC. Skeletal muscle as an alternative specimen for alcohol and drug analysis. *J Forensic Sci.* 1991;36:60–69.

184. Clark MA, Jones JW. Studies on putrefactive ethanol production. Lack of spontaneous ethanol production in intact human bodies. *J Forensic Sci.* 1982;27:366–371.
185. Christopoulos G, Kirch ER, Gearien JE. Determination of ethanol in fresh and putrefied post mortem tissues. *J Chromatogr.* 1973;87:454–472.
186. Bogusz M, Guminska M, Markiewicz J. Studies on the formation of endogenous ethanol in blood putrefying in vitro. *J Forensic Med.* 1970;17:156–168.
187. Lough PS, Fehn R. Efficacy of 1% sodium fluoride as a preservative in urine samples containing glucose and *Candida albicans*. *J Forensic Sci.* 1993;38:266–271.
188. Petkovic SM, Simic MA, Vujic DN. Postmortem production of ethanol in different tissues under controlled experimental conditions. *J Forensic Sci.* 2005;50:204–208.
189. Corry JEL. A review. Possible sources of ethanol ante- and postmortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *J Appl Bacteriol.* 1978;44:1–56.
190. Jones AW. Are changes in blood-ethanol concentration during storage analytically significant? Importance of method imprecision. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1299–1304.
191. Pounder D. Dead sober or dead drunk? May be hard to determine. *BMJ* 1998;316:87.
192. Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Sci Int.* 2006;156:213–218.
193. Droenner P, Schmitt G, Aderjan R, Zimmer H. A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. *Forensic Sci Int.* 2002;126:24–29.

194. Aradottir S, Seidl S, Wurst FM, Jonsson BA, Alling C. Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28:1718–1723.
195. Pounder DJ, Smith DRW. Postmortem diffusion of alcohol from the stomach. *Am J Forensic Med Pathol.* 1995;16:89–96.
196. Jones AW, Jonsson KA, Neri A. Peak blood–alcohol concentration and time of its occurrence after rapid drinking on an empty stomach. *J Forensic Sci.* 1991;36:376–385.
197. Plueckhahn VD, Ballard B. Diffusion of stomach alcohol and heart blood alcohol concentrations at autopsy. *J Forensic Sci.* 1967;12:463–470.
198. Pounder DJ, Yonemitsu K. Postmortem absorption of drugs and ethanol from aspirated vomitus – an experimental model. *Forensic Sci Int.* 1991;51:189–195.
199. Službeni glasnik Republike Srbije, 69/2010. Beograd. JP “Službeni glasnik”.
200. Službeni glasnik Republike Srbije, 78/2011. Beograd. JP “Službeni glasnik”.
201. Službeni glasnik Republike Srbije, 31/2013. Beograd. JP “Službeni glasnik”.
202. Službeni glasnik Republike Srbije, 85/2014. Beograd. JP “Službeni glasnik”.
203. Službeni glasnik Republike Srbije, 76/2011. Beograd. JP “Službeni glasnik”.
204. Fraser CG, Watkinson LR. Patient, specimen and analysis as potential sources of error. In: Marks V, Albertie KG, ed. *Clinical biochemistry nearer the patient.* London: Churchill Livingstone: 1985: 11–32.
205. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:750–9.

206. Fraser CG. Interpretation of clinical laboratory data. Oxford: Blackwell Scientific, 1986.
207. Fraser CG, Fogarty Y. Interpreting laboratory tests. *Br Med J.* 1989;298:1659–60.
208. Fraser CG, Petersen PH. The importance of imprecision. *Ann Clin Biochem.* 1991;28:207–11.
209. Sreerama L, Hardin GG. Improper sealing caused by the styroform integrity seals in leakproof plastic bottles lead to significant loss of ethanol in frozen evidentiary urine specimens. *J Forensic Sci.* 2003;48:672–6.
210. Dick GL, Stone HM. Alcohol loss arising from microbial contamination of drivers blood specimens. *Forensic Sci Int.* 1987;34:17–27.
211. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int.* 2007;165:10–29.
212. Winek CL, Paul LJ. Effect of short-term storage conditions on alcohol concentrations in blood from living human subjects. *Clin Chem.* 1983;29:1959–60.
213. Ferrari LA, Triszcz JM, Giannuzzi L. Kinetics of ethanol degradation in forensic blood samples. *Forensic Sci Int.* 2006;12(161):144-50
214. Parsons B. Blood Alcohol Question, TIAFT Mailing List 2002.
215. Chang RB, Smith WA, Walkin E, Reynolds PC. The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. *J Anal Toxicol.* 1984;8:66–7.
216. Narayanum S. The preanalytic phase: an important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol.* 2000;113:429–52.

217. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:358–65.
218. Smalldon KW, Brown GA. The stability of ethanol in stored blood Part II. The mechanism of ethanol oxidation. *Anal Chim Acta*. 1973;66:285–90.
219. Jones AW. Determination of liquid/air partition coefficients for dilute solutions of ethanol in water, whole blood and plasma. *J Anal Toxicol*. 1983;7:193–7.
220. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005;9:1–35.
221. Hayden PM, Layden MT, Hickey MD. The stability of alcohol content in samples of blood and urine. *Ir J Med Sci*. 1977;146:48–53.