

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Sonia Zięba

**Szacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu
w ciele szklistym oka dla potrzeb medycyny sądowej**

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej
Wydziału Lekarskiego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:
dr hab. n. farm. Marek Wiergowski

Gdańsk 2023

Praca doktorska finansowana była ze środków:

- projektu POWR.03.02.00-00-I026/17-00 współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.

Podziękowania

Chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi dr hab. Markowi Wiergowskiemu za wsparcie, przekazaną wiedzę oraz pomoc z każdej sytuacji.

Składam najszczerze podziękowania trzem kobietom:

*Mojej babci za to, że zaszczepiła we mnie chęć do nauki,
Mojej mamie za to, że codziennie uświadamia mi, że nie ma rzeczy niemożliwych,
Kasi za to, że wierzy we mnie nawet wtedy kiedy ja przestaje w siebie wierzyć.*

Pragnę również podziękować mojemu tacie, który zawsze wspiera mnie dobrym słowem.

Serdecznie dziękuję również mgr Gracjanie Stachewicz oraz dr Marcie Krzyżanowskiej za pomoc w pobieraniu materiału biologicznego, wsparcie mentalne i wiele dobrych słów.

Dziękuję również dr inż. Bartłomiejowi Cieślikowi za owocną współpracę, udostępnienie aparatury badawczej oraz przekazanie cennych uwag.

Składam także najszczerze podziękowania wszystkim współautorom artykułów oraz współpracownikom z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract.....	7
Wykaz skrótów	9
1. Wprowadzenie	11
1.1. Metody klasyczne	11
1.2. Reakcje interletalne	13
1.3. Metody biochemiczne	13
1.3.1. Materiał biologiczny	22
1.3.2. Anality.....	23
1.3.3. Metody analityczne	26
1.3.4. Elektroda jonoselektywna	29
1.3.5. Optyczna spektrometria emisyjna	34
1.4. Jony potasu w płynie ocznym	35
1.4.1. Lateralizacja	36
1.4.2. Płeć.....	36
1.4.3. Wiek.....	36
1.4.4. Przyczyna zgonu	37
1.4.5. Temperatura otoczenia	38
1.4.6. Inne czynniki.....	38
1.5. Niepewność pomiarowa.....	44
2. Cel pracy	47
3. Materiał i metody.....	48
3.1. Pobranie materiału	48
3.2. Metody analityczne	56
3.3. Procedura badawcza.....	57
4. Wyniki	59
4.1. Wybrane parametry walidacyjne metody.....	59
4.2. Analiza przypadków sekcyjnych.....	66
4.2.1. Wiek.....	74
4.2.2. Przyczyna zgonu	78
5. Dyskusja wyników.....	84
5.1. Wybrane parametry walidacyjne metody.....	84
5.2. Analiza przypadków sekcyjnych.....	87

6. Wnioski.....	92
7. Piśmiennictwo.....	94

Streszczenie

Celem pracy doktorskiej było stworzenie algorytmu postępowania umożliwiającego oszacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka z uwzględnieniem niepewności pomiarowej dla potrzeb medycyny sądowej. Wstępnie dokonano przeglądu piśmiennictwa w zakresie metod biochemicznych stosowanych w medycynie sądowej do szacowania czasu zgonu, rodzaju materiału biologicznego oraz metody analizy chemicznej. Do badań pobrano 94 próbek ciała szklistego oka w trakcie sądowo-lekarskich sekcji zwłok przeprowadzanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) w latach 2020-2023 za zgodą komisji bioetycznej (Uchwała nr NKBBN/18/2020 Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych GUMed). Ponadto zebrano informacje na temat okoliczności zgonów, w tym m.in. płeć, wiek, czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia, prawdopodobna przyczyna zgonu. Przeprowadzono optymalizację i walidację kluczowych parametrów procedury pobierania i przechowywania ciała szklistego oka (etap przedanalizy) oraz analizy instrumentalnej (etap analityczny) metodą potencjometryczną wykorzystującą potasową elektrodę jonoselektywną (ISE). Porównawczo dla wybranych próbek ciała szklistego oka oznaczono stężenie jonów potasu metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z atomizacją w plazmie indukowanej mikrofalowo (MIP-OES) we współpracy z Katedrą Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. W toku badań wykazano, iż pośmiertne stężenie jonów potasu w ciele szklistym oka ($n=94$) wzrasta w czasie do 4 dni (w zakresie 15-99 h) od chwili zgonu, przy czym duże fluktuacje poszczególnych wyników pomiarów wskazują na dużą niepewność tego szacowania, którego źródło może mieć charakter zarówno analityczny jak i pozaanalityczny. Mniejszą niepewnością charakteryzują się oznaczenia stężeń jonów potasu wykonane metodą MIP-OES, w których dla stężeń niskich potasu (2 mg/l), średnich (10 mg/l) oraz wysokich (25 mg/l) uzyskano niepewność rozszerzoną odpowiednio $\pm 1,2$, $\pm 2,2$ i $\pm 2,5$ %, natomiast dla tych samych stężeń w metodzie ISE uzyskano niepewność rozszerzoną odpowiednio $\pm 12,2$, $\pm 6,1$ i $\pm 3,1$ %. Składowe niepewności oznaczenia stężenia jonów potasu związane z metodami ISE i MIP-OES są stosunkowo niewielkie w odniesieniu do pozostałych czynników wpływających na stężenie jonów potasu (płeć, wiek, przyczyna zgonu, temperatura otoczenia, warunki przechowywania zwłok). W celu zminimalizowania ryzyka uzyskania wyników niedokładnych postulowana jest częsta kalibracja urządzeń

pomiarowych ISE i MIP-OES, kontrola parametrów pracy oraz udział w badaniach biegłości i/lub międzylaboratoryjnych. Ponadto zmniejszenie niepewności szacowania stężenia jonów potasu oraz wyznaczanego czasu zgonu można przeprowadzić poprzez wprowadzenie dodatkowych wskaźników określających czas zgonu.

Słowa kluczowe: czas zgonu, jony potasu, ciało szkliste oka, elektroda jonoselektywna, niepewność pomiaru, optyczna spektrometria emisyjna z atomizacją w plazmie indukowanej mikrofalowo

Abstract

The aim of the PhD thesis was to create an algorithm enabling the estimation of the post-mortem interval (PMI) based on the determination of the concentration of potassium ions in the vitreous humour (VH), taking into account estimation of uncertainty for the purposes of forensic medicine. Initially, a literature review was performed in the field of biochemical methods used in forensic medicine to estimate the time of death, the type of biological material and the method of chemical analysis. 94 samples of the VH were collected for research during forensic medical autopsies carried out at the Department of Forensic Medicine of the Faculty of Medicine of the Medical University of Gdańsk (MUG) in the years 2020-2023 with the consent of the bioethics committee (Resolution No. NKBBN/18/2020 of the Independent Bioethics Committee for Scientific Research MUG). In addition, information was collected on the circumstances of deaths, including: gender, age, time of death resulting from the circumstances of the event, probable cause of death. Optimization and validation of key parameters of the VH collection and storage procedure (pre-analytical stage) and instrumental analysis (analytical stage) were carried out using a potentiometric method using a potassium ion-selective electrode (ISE). Comparatively, for selected VH samples, the concentration of potassium ions was determined using microwave-induced plasma with optical emission spectrometry (MIP-OES) in cooperation with the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology. The study showed that the post-mortem concentration of potassium ions in the VH (n = 94) increases up to 4 days (in the range of 15-99 h) from the moment of death, while large fluctuations in individual measurement results indicate a high uncertainty of this estimation, the source of which may be both analytical and non-analytical. Determinations of potassium ion concentrations made using the MIP-OES method are characterized by lower uncertainty than ISE. MIP-OES results are

characterized by an uncertainty for low potassium concentrations (2 mg/l), medium (10 mg/l) and high (25 mg/l), respectively ± 1.2 , ± 2.2 and $\pm 2.5\%$. However for the same concentrations in the ISE method the expanded uncertainty of ± 12.2 , ± 6.1 and $\pm 3.1\%$ was obtained, respectively. The uncertainty components of potassium ion concentration determination related to the ISE and MIP-OES methods are relatively small in relation to other factors affecting the potassium ion concentration (gender, age, cause of death, ambient temperature, conditions of corpse storage). In order to minimize the risk of obtaining inaccurate results, frequent calibration of ISE and MIP-OES measuring devices, control of operating parameters and participation in proficiency and/or interlaboratory tests are recommended. Moreover, the uncertainty of estimating the concentration of potassium ions and the determined PMI can be reduced by introducing additional indicators determining the time of death.

Key words: potassium ions, vitreous humor, ion-selective electrode, measurement uncertainty, microwave-induced plasma with optical emission spectrometry

Wykaz skrótów

¹H NMR - *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

A - *accuracy*, dokładność

ADP - *adenosine 5'-(trihydrogen diphosphate)*, adenzyno-5'-difosforan

ASE - atomowa spektrometria emisyjna

ATP - *adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate)*, adenzyno-5'-trifosforan

C - *concentration*, stężenie

CCD - *charge-coupled device*, przyrząd ze sprzężeniem ładunkowym

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas wersenowy

GABA - *γ-aminobutyric acid*, kwas γ -aminomasłowy

GAM - *generalized additive model*, uogólniony model addytywny

GHB - *γ-hydroxybutyric acid*, kwas γ -hydroksymasłowy

HPLC/MS/MS - *high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas

HPLC-ESI-MS/MS MRM - *high performance liquid chromatography - electrospray ionisation - tandem mass spectrometry - multiple reaction monitoring*, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym detektorem spektrometrii mas w trybie jonizacji przez elektrorozpylanie oraz monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

Hx - *hypoxanthine*, hipoksantyna

ISE - *ion-selective electrode*, elektroda jonoselektywna

k - *coverage factor*, współczynnik rozszerzenia

LOD - *limit of detection*, granica wykrywalności

LOQ - *limit of quantification*, granica oznaczalności

MeOH - *methanol*, metanol

MIP-OES - *microwave-induced plasma optical emission spectrometry*, optyczna spektrometria emisyjna z atomizacją w plazmie indukowanej mikrofalowo

MP-AES – *microwave plasma - atomic emission spectroscopy*, atomizacja w plazmie indukowanej mikrofalowo - optyczna spektroskopia atomowa (synonim MIP-OES)

P - *precision*, precyzja

Pi - *phosphate anion* , anion fosforanowy

PMI - *post-mortem interval*, czas zgonu

PMI_{okol} – czas zgonu, ustalony na podstawie okoliczności zgonu

R² - *coefficient of determination*, współczynnik determinacji

SD - *standard deviation*, odchylenie standardowe

SF - *synovial fluid*, płyn maziowy

SPE - *solid-phase extraction*, ekstrakcja do fazy stałej

TOD - *time since death*, czas zgonu

Tris⁺ - *tris(hydroxymethyl)aminomethane*, kation tris(hydroksymetylo)aminometanu

TSD - *time of death*, czas zgonu

U - *measurement uncertainty*, niepewność pomiaru

U_A - *type A uncertainty*, niepewność typu A

U_B - *type B uncertainty*, niepewność typu B

V - *volume*, objętość

VH - *vitreous humor*, ciało szkliste oka

1. Wprowadzenie

Dokładne szacowanie czasu jaki upłynął od zgonu jest jednym z ważniejszych aspektów medycyny sądowej. W piśmiennictwie anglojęzycznym jest ono opisywane różnymi terminami jako m.in.: *post-mortem interval (PMI)*, *time since death (TSD)*, *time of death (TOD)*. Prawidłowe oszacowanie czasu zgonu daje podstawę do weryfikacji chronologii zdarzeń istotnych dla postępowania prowadzonego przez organy ścigania oraz wymiar sprawiedliwości. Przykładowo oszacowanie PMI może pomóc w wytypowaniu lub usunięciu osoby z kręgu podejrzanych. Może pomóc również w weryfikacji alibi oskarżonego oraz świadków zdarzenia. Określanie czasu zgonu znajduje również zastosowanie w obszarze prawa cywilnego, np. poprzez wytypowanie kolejności dziedziczenia [1]. Istnieje szereg metod, dzięki którym możemy określić czas, jaki upłynął od zgonu. W podręczniku „Medycyna sądowa” (pod redakcją Grzegorza Teresińskiego), który ukazał się 2019 roku podano następujące kategorie, które klasyfikują metody szacowania PMI: metody klasyczne, reakcje interletalne, metody biochemiczne oraz inne metody eksperymentalne [1].

1.1. Metody klasyczne

Wśród metod klasycznych wyróżniamy: metody termiczne, ocenę plam opadowych (łac. *livor mortis*) oraz ocenę stężenia pośmiertnego (łac. *rigor mortis*). Należy pamiętać, że żadna z metod klasycznych nie pozwala na dokładne oszacowanie czasu zgonu, ale zwykle pozwala na określenie przedziału czasu, w którym nastąpił zgon.

Metody oparte na pomiarze temperatury zwłok (termiczne) znajdują zastosowanie do 36 godzin od zgonu i są uznane za bardziej dokładne w stosunku do pozostałych klasycznych. Metoda termiczna wykorzystuje do oceny PMI proces oziębienia się zwłok w czasie. Powodem spadku temperatury jest proces ustania procesów przemiany materii i wyrównywania się temperatury ciała i otoczenia, zgodnie z prawem stygnięcia Newtona. Metoda ta polega na pomiarze temperatury ciała (najczęściej w odbycie), temperatury otoczenia oraz dopasowaniu ich do nomogramu Henssge'go, który został utworzony w latach 80. XX wieku. Do zalet tej metody zaliczamy m.in. opracowane podstawy teoretyczne, możliwości zastosowania w nietypowych warunkach (np. w środowisku wodnym), dostępność różnych form nomogramów (zarówno papierowych, jak i w postaci aplikacji na telefony komórkowe). Do wad metody termicznej zaliczamy: potrzebę zastosowania specjalnego termometru, duży wzrost błędu PMI wraz z upływem

czasu od zgonu oraz możliwość szacowania krótszego przedziału czasowego w przypadku niskiej temperatury otoczenia [1], [2].

Drugą metodą zaliczaną do metod klasycznych jest ocena stopnia wysycenia oraz przemieszczalności płam opadowych. Płamy opadowe najczęściej charakteryzują się sinofioletowym zabarwieniem powłok ciała. Pojawiają się one w wyniku zatrzymania krążenia i przemieszczania się krwi pod wpływem siły grawitacji do naczyń żylnych. Płamy takie początkowo odnotowuje się na bocznej i tylnej powierzchni szyi, okolicy lędźwiowej lub klatce piersiowej. Po około 2-3 godzinach płamy się powiększają i dochodzi do ich zlania się ze sobą. Do 6 godzin od śmierci płamy są kompletnie przemieszczalne, od 6-12 godzin są niekompletnie przemieszczalne, powyżej 12 godzin nie odnotowuje się przemieszczania. Do zalet tej metody zaliczamy: prostotę badania, oraz możliwość ustalenia zmiany pozycji zwłok. Do wad zaliczamy przede wszystkim: konieczność posiadania doświadczenia u osoby badającej oraz duży błąd przy szacowaniu PMI [1], [2].

Trzecią metodą zaliczaną do metod klasycznych jest ocena stężenia pośmiertnego. Stężenie pośmiertne charakteryzuje skrócenie oraz usztywnienie mięśniowe, które jest wynikiem zmian biochemicznych zachodzących w mięśniach po śmierci. Głównym czynnikiem, który jest odpowiedzialny za ten proces, jest ATP. Po zgonie hydroliza ATP jest kontynuowana aż do wyczerpania się zapasów glukozy. Z uwagi na brak resyntezy ATP powstają kompleksy aktomiozynowe, które są lepkie. To właśnie one powodują skrócenie i usztywnienie mięśni. Po upływie 1-3 godzin stężenie pośmiertne można zaobserwować w drobnych mięśniach palców i stóp oraz mięśniach mimicznych twarzy. W ciągu 6-8 godzin stężenie pośmiertne rozwija się w pozostałych mięśniach. Przed upływem tego czasu po siłowym zgięciu kończyny, w której zaobserwowano stężenie pośmiertne proces ten ponownie się rozwija, ale jest mniej wyraźny. Do zalet powyższej metody zaliczamy: łatwość stosowania metody oraz powrót stężenia po przełamaniu. Do wad metody zaliczamy: ograniczony przedział czasowy (do 10 godzin), duży błąd szacowania PMI oraz duży wpływ doświadczenia osoby, która przeprowadza badanie na szacowanie PMI [1], [2].

1.2. Reakcje interletalne

Wyróżniamy trzy metody badania reakcji interletalnych. Pierwszą z nich jest ocena pobudliwości mechanicznej mięśni szkieletowych na bodziec mechaniczny (występuje ono przede wszystkim w obrębie mięśni dwugłowego ramienia i czterogłowego uda). Zaletą metody jest prostota badania, natomiast jej ograniczeniem jest przede wszystkim brak standaryzacji pomiaru. Drugą z metod jest reakcja mięśni twarzy na bodziec elektryczny (mięśni okrężnych oka oraz ust). Trzecią metodą jest reakcja źrenic na bodziec chemiczny. Do zalet metody badania reakcji interletalnych zaliczamy: relatywnie szeroki zakres stosowania (do 15 godzin) oraz umożliwienie oceny różnych grup mięśni. Do ograniczeń metody można zaliczyć konieczność zastosowania dedykowanego sprzętu oraz brak standaryzacji pomiaru [1].

W przypadku metody wykorzystującej reakcję źrenic na bodziec chemiczny do worka spojówkowego lub przedniej komory oka wstrzykuje się substancje zwężające źrenice (np. pilokarpinę) lub rozszerzające źrenice (np. atropinę). Przy wstrzyknięciu w/w substancji do worka spojówkowego reakcja następuje do 4 godzin po zgonie. W przypadku wstrzyknięcia w/w substancji do przedniej komory oka można zaobserwować reakcje po 20-30 minutach od podania do około 20 godzin od zgonu. Do zalet metody zaliczamy: zakres zastosowania do 20 godzin, natomiast ograniczeniem w jej zastosowaniu jest brak standaryzacji pomiaru oraz wymóg zastosowania specjalnych odczynników [1].

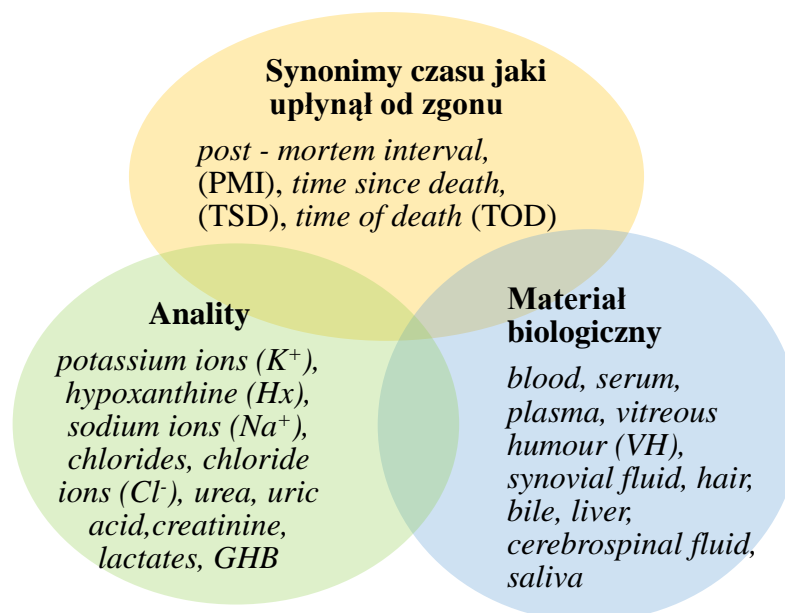
1.3. Metody biochemiczne

Metody biochemiczne nie weszły jeszcze na szeroką skalę do praktyki, jednak w przyszłości będą one stanowić ważne uzupełnienie klasycznych metod z uwagi na możliwość obiektywizacji, standaryzacji i uzyskania wyników jakościowo-ilościowych. Z reguły w metodach biochemicznych poszukuje się korelacji pomiędzy substancjami endogennymi, które zmieniają swoje stężenie po zgonie z upływem czasu. Poniżej dokonano przeglądu literaturowego pod kątem znalezienia substancji endogennych, które mają znaczenie w szacowaniu czasu zgonu oraz materiałów biologicznych, w których oznacza się stężenie tych substancji. Przegląd obejmował publikacje znajdujące się w bazie PubMed do 2021 roku włącznie [3]. Słowa kluczowe i ich skróty wpisywano do

bazy w języku angielskim, co wyróżniono poniżej pismem pochyłym. Przeglądu dokonano poprzez wpisywanie kombinacji następujących słów kluczowych zebranych w trzy grupy:

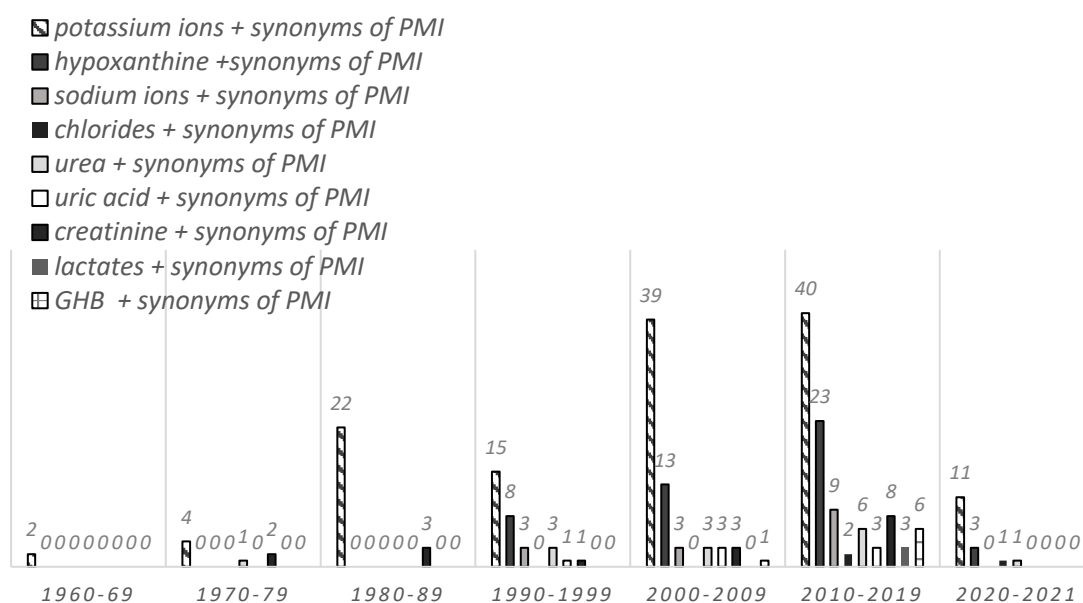
1. Anality – 9 słów kluczowych substancji endogennych zmieniających stężenie po zgonie oraz ich synonimów: jony potasu (*potassium ions*, K^+), hipoksantyna (*hypoxanthine*, Hx), jony sodu (*sodium ions*, Na^+), chlorki (*chlorides*, *chloride ions*, Cl^-), mocznik (*urea*, *carbamide*), kwas moczowy (*uric acid*), kreatynina (*creatinine*), mleczały (*lactates*), kwas γ -hydroksymasłowy (*gamma-hydroxybutyric acid*, GHB).
2. Materiały biologiczne – 10 słów kluczowych: krew (*blood*), surowica (*serum*), osocze (*plasma*), ciało szkliste oka (*vitreous humor*, *vitreous body*, VH), maź stawowa (*synovial fluid*), włosy (*hair*), żółć (*bile*), wątroba (*liver*), płyn mózgowo-rdzeniowy (*cerebrospinal fluid*), ślina (*saliva*).
3. Synonimy czasu jaki upłynął od zgonu w postaci nazw angielskich - *post - mortem interval* (PMI), *time since death* (TSD), *time of death* (TOD).

Poszukiwano artykułów poprzez koniunkcję logiczną w/w wybranych materiałów biologicznych, synonimów czasu jaki upłynął od zgonu oraz analitów (ryc. 1.1.).

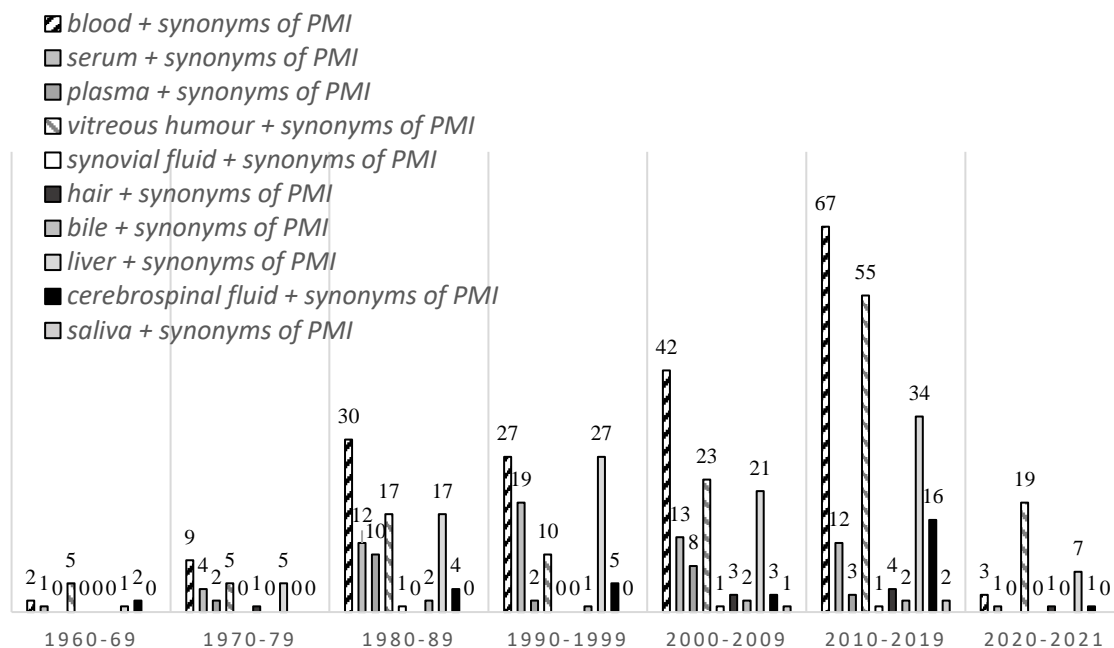


Ryc. 1.1. Słowa kluczowe pogrupowane w trzy kategorie: synonimy czasu jaki upłynął od zgonu, anality, materiały biologiczne

Następnie zawężono obszar poszukiwań wybierając okres 1960-2021, co ograniczyło liczbę wyselekcjonowanych publikacji i pozwoliło na lepsze dopasowanie merytoryczne artykułów. W kategorii słów kluczowych „analit” i „materiał biologiczny” (na rysunkach i w tabelach poniżej koniunkcja pomiędzy grupami będzie wyrażana za pomocą znaku „+”) najczęściej artykułów dotyczyło jonów potasu oraz hipoksyantyny (ryc. 1.2.). W grupie słów kluczowych „materiał biologiczny” oraz „synonimów czasu jaki upłynął od zgonu” większość artykułów dotyczyła krwi oraz ciała szklistego oka (ryc. 1.3.).



Ryc. 1.2. Liczba publikacji, które ukazały się w dekadach w okresie lat 1960-2021 (z wyjątkiem lat 2020-2021, które obejmowały tylko dwa lata) dotyczące „analitów” oraz synonimów PMI



Ryc. 1.3. Liczba publikacji, które ukazały się w dekadach w okresie lat 1960-2021 (z wyjątkiem lat 2020-2021, które obejmowały tylko dwa lata) dotyczące „materiału biologicznego” oraz synonimów PMI

W tabeli 1.1. przedstawiono wszystkie wyniki dla grupy słów kluczowych „analizy” oraz „synonimy PMI”, przy czym najczęściej skojarzonymi słowami kluczowymi okazały się *potassium ions* oraz *post mortem interval* (n=63). Najmniej wyników uzyskano dla skrótów i wyrażen TSD, TOD i *post mortem intervallum*. Słowa kluczowe będące skrótami nie zawsze korelowały znaczeniowo w odniesieniu do oczekiwanego wyniku, gdyż napotkano na inne rozwinięcia skrótów: TSD - *total saponins of dioscorea*, TOD - *target organ damage*. Słowo *post mortem intervallum* było stosowane najczęściej w publikacjach dotyczących entomologii sądowej. Stąd wstępną liczbę artykułów skorygowano, tak aby uzyskać lepsze dopasowanie terminów związanych z metodami biochemicznymi w szacowaniu PMI. W tabeli 1.2. przedstawiono pełne wyniki dla grup ze słowami kluczowymi: „materiał biologiczny” oraz „synonim PMI”. Najbardziej trafnymi słowami kluczowymi okazały się *blood* oraz *time of death* (n=137).

Tab. 1.1. Liczba publikacji dla słów kluczowych „analit” i „synonimy PMI” w latach 1960-2021

Analit + synonim PMI	Liczba artykułów								wstępna	skorygowana
	1960-1969	1970-1979	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2019	2020-2021			
<i>potassium ions + post - mortem interval</i>	0	0	8	6	18	23	8	268	63	
<i>potassium ions + time since death</i>	0	0	2	5	6	5	2	125	20	
<i>potassium ions + time of death</i>	2	4	12	4	15	12	1	262	50	
SUMA	2	4	22	15	39	40	11	655	133	
<i>hypoxanthine + post - mortem interval</i>	0	0	0	3	10	17	3	46	33	
<i>hypoxanthine + time since death</i>	0	0	0	2	3	2	0	15	7	
<i>hypoxanthine + time of death</i>	0	0	0	3	0	4	0	23	7	
SUMA	0	0	0	8	13	23	3	84	47	
<i>sodium ions + post - mortem interval</i>	0	0	0	2	1	6	0	58	9	
<i>sodium ions + time since death</i>	0	0	0	0	1	3	0	21	4	
<i>sodium ions + time of death</i>	0	0	0	1	1	0	0	67	2	
SUMA	0	0	0	3	3	9	0	146	15	
<i>chlorides + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	2	0	35	2	
<i>chlorides + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	18	0	
<i>chlorides + time of death</i>	0	0	0	0	0	0	1	49	1	
SUMA	0	0	0	0	0	2	1	102	3	
<i>urea + post - mortem interval</i>	0	0	0	1	2	4	0	24	7	
<i>urea + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	14	0	
<i>urea + time of death</i>	0	1	0	2	1	2	1	44	7	
SUMA	0	1	0	3	3	6	1	82	14	
<i>uric acid + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	1	3	0	8	4	
<i>uric acid + time since death</i>	0	0	0	0	2	0	0	14	2	
<i>uric acid + time of death</i>	0	0	0	1	0	0	0	27	1	
SUMA	0	0	0	1	3	3	0	49	7	
<i>creatinine + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	1	2	0	41	3	
<i>creatinine + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	5	0	
<i>creatinine + time of death</i>	0	2	3	1	2	6	0	161	14	

Analit + synonim PMI	Liczba artykułów								wstępna	skorygowana
	1960-1969	1970-1979	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2019	2020-2021			
SUMA	0	2	3	1	3	8	0	207	17	
<i>lactates + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	2	0	2	2	
<i>lactates + time since death</i>	0	0	0	0	0	1	0	5	1	
<i>lactates + time of death</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	0	
SUMA	0	0	0	0	0	3	0	15	3	
<i>GHB + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	6	0	6	6	
<i>GHB + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>GHB + time of death</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
SUMA	0	0	0	0	1	6	0	7	7	

Tab. 1.2. Liczba publikacji dla słów kluczowych „materiały biologiczne” i „synonimy PMI” w latach 1960-2021

Material biologiczny + synonim PMI	Liczba artykułów								wstępna	skorygowana
	1960-1969	1970-1979	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2019	2020-2021			
<i>blood + post - mortem interval</i>	0	0	3	2	7	27	0	561	39	
<i>blood + time since death</i>	0	0	0	1	1	2	0	191	4	
<i>blood + time of death</i>	2	9	27	24	34	38	3	1216	137	
SUMA	2	9	30	27	42	67	3	1968	180	
<i>serum + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	1	8	2	169	11	
<i>serum + time since death</i>	0	0	0	0	1	0	0	56	1	
<i>serum + time of death</i>	1	4	12	19	13	12	1	308	62	
SUMA	1	4	12	19	15	20	3	533	74	
<i>plasma + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	4	0	203	4	
<i>plasma + time since death</i>	0	0	0	1	2	1	0	52	4	
<i>plasma + time of death</i>	0	2	10	2	8	3	0	229	25	
SUMA	0	2	10	3	10	8	0	484	33	
<i>vitreous humour + post - mortem interval</i>	0	0	6	3	14	26	12	169	61	
<i>vitreous humour + time since death</i>	0	0	0	2	3	15	6	76	26	
<i>vitreous humour + time of death</i>	5	5	11	5	6	14	1	140	47	
SUMA	5	5	17	10	23	55	19	385	134	

Material biologiczny + synonim PMI	Liczba artykułów							wstępna	skory- gowana
	1960- 1969	1970- 1979	1980- 1989	1990- 1999	2000- 2009	2010- 2019	2020- 2021		
<i>synovial fluid + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>synovial fluid + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>synovial fluid + time of death</i>	0	0	1	0	0	1	0	7	2
SUMA	0	0	1	0	1	1	0	10	3
<i>hair + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	3	0	12	3
<i>hair + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>hair + time of death</i>	0	1	0	0	3	1	1	38	6
SUMA	0	1	0	0	3	4	1	53	9
<i>bile + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	0	0	10	0
<i>bile + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>bile + time of death</i>	0	0	2	1	2	2	0	38	7
SUMA	0	0	2	1	2	2	0	49	7
<i>liver + post - mortem interval</i>	0	0	0	1	9	9	2	159	21
<i>liver + time since death</i>	0	0	0	0	0	1	0	37	1
<i>liver + time of death</i>	1	5	17	27	12	24	5	429	91
SUMA	1	5	17	28	21	34	7	625	113
<i>cerebrospinal fluid + post - mortem interval</i>	0	0	0	2	0	6	0	26	8
<i>cerebrospinal fluid + time since death</i>	0	0	0	1	1	3	0	13	5
<i>cerebrospinal fluid + time of death</i>	2	0	4	2	2	7	1	64	18
SUMA	2	0	4	5	3	16	1	103	31
<i>saliva + post - mortem interval</i>	0	0	0	0	0	1	0	2	1
<i>saliva + time since death</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>saliva + time of death</i>	0	0	0	0	1	1	0	12	2
SUMA	0	0	0	0	1	2	0	18	3

W celu aktualizacji stanu wiedzy na temat ustalania czasu zgonu metodą biochemiczną. Dokonano ponownego przeglądu artykułów naukowych, które ukazały się w bazie PubMed w latach 2022-2023. W 2022 roku w czasopiśmie *Forensic Science International* ukazał się artykuł autorstwa Yotvarit Charunyanont oraz

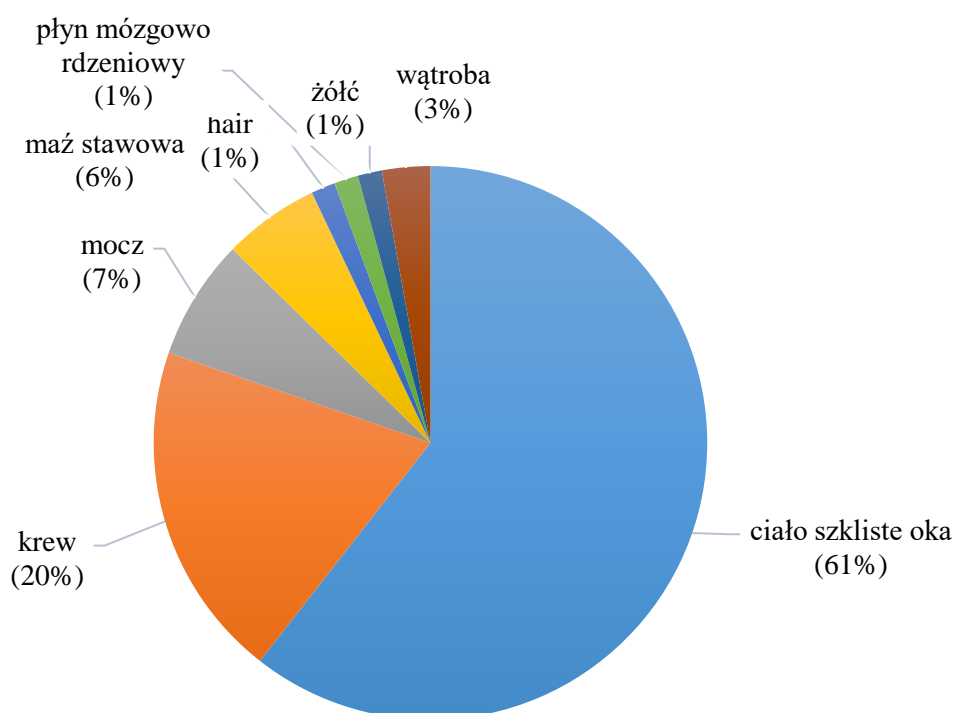
współpracowników dotyczący wpływu temperatury na pośmiertny wzrost stężenia GHB we krwi. Badaniu zostały poddane próbki pochodzące z 41 ciał osób, które przed śmiercią nie zażyły GHB. W każdym przypadku odnotowywano: płeć, wiek, przyczynę śmierci, czas pobrania próbki oraz temperaturę w odbycie. Stwierdzono, iż po osiągnięciu maksymalnego stężenia pośmiertnego GHB we krwi w ochłodzonych zwłokach, pomimo rosnącego PMI nie następuje znacząca różnica wytwarzania GHB. Ponadto odnotowano, że w ciałach tych powstawanie GHB następuje głównie we wczesnym okresie pośmiertnym[4]. W tym samym roku w czasopiśmie *Journal of Analytical Toxicology* ukazał się artykuł autorstwa Theresy Küting oraz współpracowników dotyczący korelacji czasu zgonu z pośmiertnym stężeniem GHB. Za materiał badawczy posłużyły następujące matryce biologiczne: krew z serca, krew z żyły udowej, ciało szkliste oka, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz mocz. Stężenie w powyższych materiałach były badano po: 1 dniu, 7 dniach, 2 tygodniach, 4 tygodniach oraz 6 miesiącach. W badaniach stwierdzono, że stężenie GHB we krwi pobranej z żyły udowej oraz krwi z serca było wyższe w stosunku do stężenia tej substancji w ciele szklistym oka, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz moczu. Miało to miejsce niezależnie od stabilizacji oraz sposobu przechowywania materiału. Żadne z uzyskanych stężeń nie przekroczyło wartości odcięcia stosowanej do identyfikacji endogennego stężenia GHB. Ponadto, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu GHB mierzonym bezpośrednio po zgonie oraz po 6 miesiącach. Stwierdzono natomiast istotny wzrost stężenia GHB po 4 tygodniach oraz 3 miesiącach od pobrania próbki. Po trzech miesiącach nastąpił spadek stężenia do wartości początkowych [5]. W 2022 roku w czasopiśmie *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* ukazał się artykuł autorstwa Poovaragavan oraz współpracowników, dotyczący przekrojowych badań porównawczych, które zostały przeprowadzone w celu zbadania korelacji między czasem jaki upłynął od zgonu, a parametrami biochemicznym mazi stawowej. Zbadano następujące analizy: sód, potas, mleczały oraz białko całkowite. Badaniu zostały poddane próbki pochodzące od 61 osób. Wszystkie parametry, za wyjątkiem sodu, wykazały istotną korelację z PMI. W przypadku potasu i mleczałów zaobserwowano istotną dodatnią korelację, natomiast w przypadku białka całkowitego odnotowano ujemną korelację. Powyższe badanie wykazało przydatność powyższych markerów. Autorzy jednocześnie podkreślili, że ich badanie zostało przeprowadzone na niewielkiej próbie (61 osób) oraz nie zostały wzięte pod uwagę parametry temperaturowej tj. temperatura w chłodni [6]. W 2023 roku ukazał się artykuł autorstwa Manuela Febrero Bande oraz współpracowników, w którym

zamieścił on aplikację internetową (<http://modesty.usc.es:3838/Forensic/>), dzięki której można określić jaki czas upłynął od zgonu na podstawie stężeń następujących substancji w ciele szklistym oka: potasu, hipoksantyny oraz mocznika. Aplikacja została utworzona w oparciu o dwie bazy danych: 331 przypadków (baza numer 1) oraz 201 przypadków (baza numer 2). W bazach danych znalazły się przypadki, które zidentyfikowano jako zgony nagłe. Odnotowano następujące informacje: płeć, wiek, masę ciała, PMI, temperaturę zmierzoną w odbycie, temperaturę otoczenia w chwili pobrania próbki oraz przyczynę zgonu. Powyższa publikacja upraszcza procedurę obliczeniową, dostarczając szacunki PMI z 95% przedziałem ufności. Niezależnie od zastosowanej metody obliczeniowej i parametrów fizykochemicznych szacowana dolna i górna granica tolerancji czasu zgonu wynosi najczęściej od kilka do kilkunastu godzin [7]. W tym samym roku w czasopiśmie *International Journal of Legal Medicine* ukazał się artykuł autorstwa Emanuela Locci'ego oraz współpracowników, w którym do oszacowania czasu zgonu zastosowano łącznie metabolomikę (analizą jakościową i ilościową niskocząsteczkowych metabolitów) techniką spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR w ciele szklistym oka oraz badania stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka. Próbkę ciała szklistego pobrano w przedziale czasowym 6-86 h od śmierci. Doświadczenie przeprowadzono przy użyciu metabolomiki ^1H NMR i analizy kapilarnej jonów. Zbudowano wieloczynnikowy model kalibracji w celu oszacowania PMI na podstawie 47 próbek ciała szklistego. Model poddano walidacji na niezależnym zestawie testowym składającym się z 24 próbek, uzyskując błąd predykcji w całym zakresie 6,9 h dla PMI < 24 h, 7,4 h dla PMI od 24 do 48 h oraz 10,3 h dla PMI > 48 h. Autorzy stwierdzili, że profil metabolomiczny ciała szklistego wyznaczony techniką ^1H NMR może pomóc w lepszym przewidywaniu PMI niż potas do 48 godzin po śmierci, natomiast dla dłuższego od 48 h PMI właściwsze będzie połączenie ^1H NMR i stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka[8]. W roku 2023 *International Journal of Legal Medicine* ukazał się również artykuł autorstwa Alberto Chighine oraz współpracowników, w którym zastosowano podejście metabolomiczne oparte na spektroskopii ^1H NMR, które miało na celu ustalić możliwość monitorowania pośmiertnych zmian metabolitów w płynie osierdziowym w celu zbudowania wieloczynnikowego modelu regresji do oszacowania PMI. Pod uwagę zostały wzięte próbki pochodzące od 24 osób, dla których czas zgonu wynosił od 16 do 170 h. Cholina, glicyna, etanoloamina i hipoksantyna były najważniejszymi metabolitami zastosowanymi w modelu predykcyjnym. Błąd przewidywania PMI wyniósł 33-34

godziny, a gdy okno czasowe PMI zostało zawężone (poniżej 100 h), to błąd przewidywania PMI wyraźnie się zmniejszył i wynosił 13-15 h [9].

1.3.1. Materiał biologiczny

Analiza literatury pozwoliła na zidentyfikowanie 55 artykułów, które spełniały kryteria wyłączenia. Najczęściej badanym materiałem biologicznym było ciało szkliste oka (61% publikacji, ryc. 1.4.) [2], [10]–[63] co prawdopodobnie wynika z faktu, że jest to najmniej zanieczyszczony płyn biologiczny i autoliza zachodzi w niej wolniej niż w innych materiałach biologicznych pobieranych podczas sekcji (tj. krwi, moczu)[12]. Z drugiej strony zgłaszano problemy związane z niewielką objętością ciała szklanego oka, ponieważ objętość pobieranego materiału zwykle nie przekracza 1-2 ml [51]



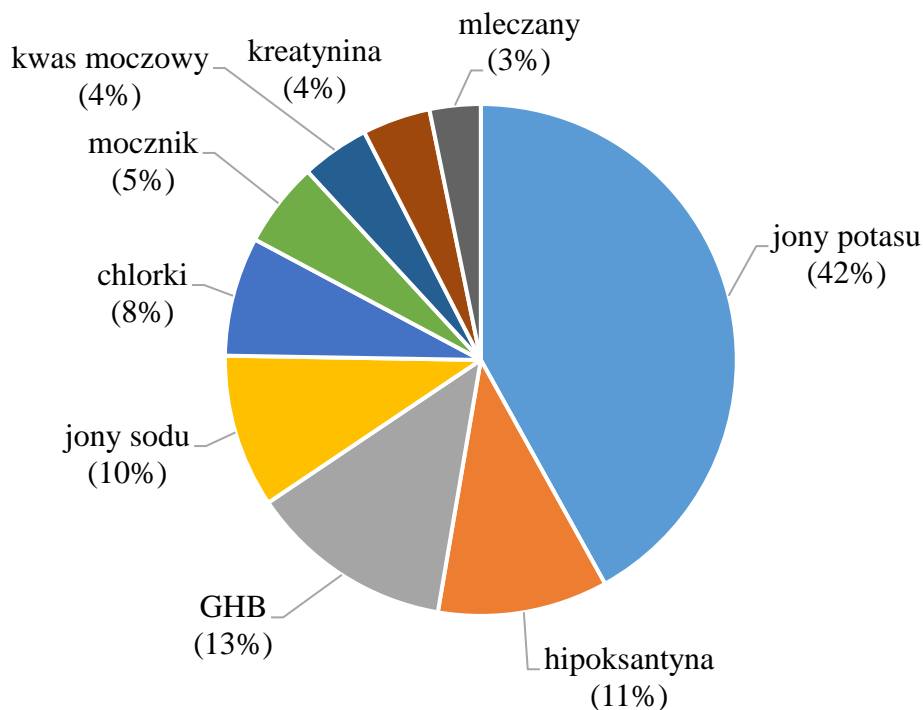
Ryc. 1.4. Procentowy udział materiałów biologicznych wykorzystywanych w ustalaniu PMI (w niektórych publikacjach występowały dwa lub więcej materiały biologiczne) [2], [10]–[63]

Drugim najczęściej badanym materiałem biologicznym była krew (20 %). Zaletą tego materiału jest możliwość pobrania go w dużej objętości podczas sekcji zwłok (do 50 ml). Z drugiej strony krew jest podatna na autolizę i zanieczyszczenie. Spośród wszystkich materiałów rutynowo pobieranych podczas sekcji zwłok najmniej badań dotyczyło moczu (7%) w porównaniu z krwią i ciałem szklistym. Wadą moczu jest to, że może być zanieczyszczony i nie zawsze jest dostępny. Niektórzy autorzy analizowali więcej niż jedną matrycę biologiczną, najczęściej były to krew oraz ciało szkliste oka [47], [52], [53].

W ostatnim czasie coraz częściej jako materiał biologiczny wykorzystuje się też maź stawową (6%). Maź stawowa jest materiałem dobrze izolowanym i chronionym dzięki kaletce maziowej, wykazuje mniejszą podatność na pośmiertną autolizę spowodowaną rozwojem bakterii (porównywalnie z ciałem szklistym) [57]. Jednak maź stawowa jest rzadko badana, z uwagi na to, że nie jest rutynowo pobierana podczas sekcji zwłok. Pozostałe matryce stanowiły 6% wszystkich materiałów biologicznych i obejmowały włosy, żółć, wątrobę, płyn mózgowo-rdzeniowy [11], [38], [46], [52]. Niektórzy autorzy analizowali kilka materiałów biologicznych [11], [14], [32], [38], [44], [48], [53].

1.3.2. Anality

Po wstępnej analizie jako marker PMI (tj. substancja, którą można wykorzystać do oszacowania PMI) wstępnie wybrano jony potasu (ryc. 1.5.). Spośród pozostałych substancji najwięcej publikacji odnotowano w przypadku GHB (13%), przy czym przydatność GHB jako wskaźnika PMI jest wątpliwa. GHB występuje naturalnie w organizmie człowieka oraz jest prekursorem kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), glutaminianu i glicyny. Niezależnie od naturalnego uwolnienia GHB po śmierci, ta substancja psychoaktywna może być wykryta w materiale biologicznym ze względu na przyżyciowe przyjęcie w celu odurzenia lub może być podana z zamiarem ułatwienia wykorzystania seksualnego [42]. Ponadto ustalono dość szerokie granice pośmiertnego stężenia GHB w materiale biologicznym, co może wskazywać na wielość czynników wpływających na jej zawartość [11], [41], [44], [46].



Ryc. 1.5. Procentowy udział analitów w publikacjach dotyczących ustalania czasu zgonu (w niektórych publikacjach występowały dwa lub więcej anality) [2], [10]–[63]

Hipoksantyna, obok jonów potasu i GHB, jest trzecim najczęściej oznaczanym analitem pod względem oceny PMI. Jest produktem rozkładu puryn i po śmierci dyfunduje z gradientem stężeń z siatkówki do ciała szklistego oka, gdzie powszechnie mierzy się jej poziom wraz ze stężeniem jonów potasu [13], [15], [34], [43]. Próbkę przygotowuje się przez wirowanie lub izolację i wzbogacanie technikami ekstrakcji do fazy stałej (SPE), natomiast analiza końcowa realizowana jest metodami instrumentalnymi z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (HPLC/MS/MS)[13], [15], [35].

Pośmiertny poziom stężenia hipoksantyny wzrasta wraz z PMI. Wzrost ten jest zależny od temperatury, tzn. im wyższa temperatura otoczenia, tym wyższy poziom hipoksantyny [13]. Cordeiro i in. [16] opracowali pięć modeli szacowania PMI (przedstawionych w tabeli 1.3) i zaobserwowali, że stężenia potasu i hipoksantyny rosną w czasie, ale korelacja słabnie. Wzrost stężenia hipoksantyny można zaobserwować nawet do 120 godzin po śmierci [34]. Wiek i płeć nie mają wpływu na poziom stężenia hipoksantyny

[64]. Salam i in. [64] przeprowadzili badanie analizujące korelację stężenia jonów potasu i hipoksantyny z PMI (tab. 1.3. oraz tab. 1.4.). Odkryli, że najwyższe stężenie można zaobserwować w okresie od 24 do 60 h po śmierci, a najniższe w pierwszych kilku godzinach po śmierci. Sztywność, obrzęk oraz zmętnienie rogówki określono na podstawie poniższej skali (tab. 1.4.).

Tab. 1.3. Oszacowanie PMI na podstawie stężenia jonów potasu (K^+), hipoksantyny (Hx), sztywności, obrzęku, zmętnienia rogówki [64]

	Wzór przewidujący wartość szacowanego PMI (h)	R ²
1.	$PMI = 1,377 [K^+] + 9,050$	0.370
2.	$PMI = 0,027 [Hx] + 15,401$	0.207
3.	$PMI = 0,978 [K^+] + 0,014 [Hx] + 9,178$	0.285
4.	$PMI = 2,02 \text{ sztywność} + 6.31 \text{ obrzęk} + 6.94 \text{ zmętnienie rogówki} - 24.94$	0.717
5.	$PMI = 0,667 K^+ + 0,003 Hx - 0.191 \text{ sztywność} + 4,907 \text{ obrzęk} + 4,68 \text{ zmętnienie rogówki} - 13,624$	0,780

[K⁺] – stężenie jonów potasu, [Hx] – stężenie hipoksantyny, R²- współczynnik determinacji

Tab. 1.4. Punkcja dla stopni rozwoju trzech zmian pośmiertnych

Punkt	Sztywność	Obrzęk	Zmętnienie rogówki
1	przed wystąpieniem (brak)	przed pojawieniem (niewidoczne)	bez zmętnienia
2	częściowo obecne	łatwe do przemieszczenia po naciśnięciu kciukiem	zaznaczone zmętnienie
3	całkowicie obecne	ciężkie do przemieszczenia po naciśnięciu kciukiem	średnie zmętnienie
4	częściowe ustąpienie	nieprzemieszczalne (nie ustępują)	silne zmętnienie
5	całkowite ustąpienie (brak)	nie dotyczy	nie dotyczy

1.3.3. Metody analityczne

Ciało szkliste pobiera się z obu oczu za pomocą igły i strzykawki o pojemności 5-10 ml, stosując odpowiednią technikę, która pozwala na pobranie ok. 1-2 ml płynu. Płyn ten należy przenieść do czystej próbówki i odwirować przy 3000 g przez 15 minut. Następnie supernatant przenosi się do innej czystej próbówki i zamraża w temperaturze -20 °C [34]. Ciało szkliste pobrane z obu oczu można przenosić i przechowywać w jednym pojemniku, ponieważ różnica w poziomie stężenia jonów potasu między prawym i lewym okiem jest niewielka i nieistotna statystycznie [20]. Stężenia jonów potasu, sodu i chlorków są najczęściej mierzone potencjometrycznie za pomocą elektrody jonoselektywnej. Analiza piśmiennictwa pod kątem metodologii przygotowania próbki materiału biologicznego (głównie ciała szklistego oka) wykazała (tab. 1.5.), że oczyszczenie matrycy biologicznej z cząstek stałych i uzyskanie supernatantu wymagało wirowania (2000-3500 obr./min przez co najmniej 5 min). Analiza instrumentalna obejmowała najczęściej metodę potencjometryczną z wykorzystaniem elektrod jonoselektywnych. Próbki biologiczne przechowywano schłodzone lub zamrożone do dalszej analizy (4 °C, -20 °C, -70 °C, -80 °C) [18], [19], [27], [28], [30], [62].

Tab. 1.5. Metody oznaczania markerów PMI w różnych matrycach biologicznych (VH - ciało szkliste oka, SF - płyn maziowy) [12], [13], [16], [17], [19], [20], [23], [25], [27], [30]–[32], [34], [36], [38], [51]

Lp.	Analit	Objętość	Przygotowanie próbki	Aparatura	LOQ/ LOD	R ²
1.	K ⁺	VH (0.1 ml)	Próbki przechowywano w temperaturze -20°C. Wirowano przy 16 000 obr./min przez 10 min, zdekantowano tylko supernatant.	fotometria, potencjometria, turbidymetria (ARCHITECT 8000)	brak danych	0.851
2.	K ⁺	VH (0.1 ml)	Próbki przechowywano w temperaturze -20°C. Rozcieńczono 1:20 wodnym roztworem chlorku baru o stężeniu 40 mg/ml (wzorzec wewnętrzny).	elektroforogram kapilarny z detektorem absorpcji UV (AP ACE MDQ; kolumna kapilarna - 75 mm ID × 50 cm, 60 cm)	LOD 9 μmol/L	0,999
3.	K ⁺	VH	Próbki odwirowano.	elektroda jonoselektywna (system chemiczny ADVIA 2400)	brak danych	brak danych

Lp.	Analit	Objętość	Przygotowanie próbki	Aparatura	LOQ/ LOD	R ²
4.	K ⁺	VH (0.2 ml)	Niepoddane obróbce wstępnej (bez rozcieńczania, wirowania lub sonikacji).	elektroda jonoselektywna (radiometr ABL 625 z UniCel Dx C 800)	LOQ 100 μmol/L	brak danych
5.	K ⁺	VH, blood (1,5-2 ml)	Krew w probówkach z EDTA. VH w sterylnych zwykłych fiolkach. Próbki wirowano przy 3500 obr/min przez 10 min.	elektroda jonoselektywna (analizator AU680)	brak danych	brak danych
6.	K ⁺	VH (0.1 ml)	Próbki przechowywano w temperaturze -70°C.	turbidymetria (Humalyzer Junior)	brak danych	brak danych
7.	K ⁺	VH (2 ml)	Odwirowano przy 4500 obr/min i supernatant przeniesiono do innego pojemnika.	elektroda jonoselektywna, przepływowa, ciekła elektroda membranowa (Roche 9180 Electrolyte Analyzer)	brak danych	brak danych
8.	K ⁺	VH (0.15 ml)	Brak danych	potencjometria pośrednia (Advia 2400).	brak danych	0,99
9.	K ⁺	VH (3-4 ml)	Próbki przechowywano w 4°C, wirowano przy 2000 obr./min przez 5 min.	fotometria płomieniowa (FLM3, Biolyte 2000)	brak danych	brak danych
10.	K ⁺	VH (2.5 ml)	Wirowano przy 2050 obr./min przez 10 min.	elektroda jonoselektywna (analizator automatyczny LX20)	brak danych	brak danych
11.	K ⁺	SF (1-1.5 ml)	Próbki przechowywano w -80°C, wirowano przy 3500 obr./min przez 10 min.	elektroda jonoselektywna (AVL 9181)	brak danych	0.756
12.	K ⁺	VH (1.5–2 ml)	Próbki wirowano przy 3500 obr./min przez 10 min.	elektroda jonoselektywna (metoda potencjometrii pośredniej)	brak danych	brak danych
13.	K ⁺	VH	Próbki przechowywano w 4°C, wirowano przy 3000 obr./min przez 10 min.	potencjometria pośrednia (BM/747)	brak danych	brak danych
14.	K ⁺	VH SF	Odwirowano przy 13 000 g przez 10 min. Roztwory supernatantu przechowywano w temperaturze -80°C. Worteksować przez 10 s. Lepkie próbki SF rozcieńczono wodą dejonizowaną.	fotometria, potencjometria, turbidymetria (ARCHITECT c16000)	brak danych	brak danych
15.	K ⁺	CSF (5 ml) VH (2 ml)	Próbki przechowywano w -18°C I -70°C. Wirowano przy 3000 obr/min przez 10 min.	elektroda jonoselektywna (analizator automatyczny Beckmana)	brak danych	brak danych
16.	K ⁺	VH (2ml)	Próbki przechowywano w temperaturze -80°C. Worteksować przez 30 s przy użyciu najwyższego	metoda potencjometryczna (VLYTE1)	brak danych	0,73

Lp.	Analit	Objętość	Przygotowanie próbki	Aparatura	LOQ/ LOD	R ²
			poziomu. Odwirowano, 1650 x g przez 8 min. Supernatant podzielono na cztery porcje	Zintegrowany multisensor K800A),		
17.	Hx	VH	Przygotowano w wodzie dejonizowanej i przesączono przez jednostkę filtrującą o wielkości porów 0,45 mm. Wytrząsać i odpipetować do jednostki filtrującej. Wirowano przy 9000 obr/min przez 90 min w 4°C. Próbki przechowywano w -20°C i -75°C.	elektroforeza kapilarna (BioFocus 3000, kolumna: 50 mm śr. x 30 cm)	brak danych	0.921
18.	Hx	VH (0.1 ml)	Próbki przechowywano w temperaturze -70°C.	Kolorymetria (zestaw Amplex Red Xanthine/ Xanthine Oxidase Assay).	brak danych	brak danych
19.	Hx	VH (0.15 ml)	Wirowano przy 14500 obr/min przez 10 min. Do próbek dodano 2 ml 2 mM wodorotlenku amonu i 25 µl wzorców wewnętrznych. SPE (OASIS MAX) stosowany do oczyszczania próbek. Wkłady kondycjonowano 2 ml metanolu i 2 ml wody przed załadowaniem próbek do kolumny SPE. Przemyci 2 ml 5% wodorotlenku amonu w wodzie i 2 ml 5% wodorotlenku amonu w metanolu. Suszono wkłady przez 10 minut pod próżnią, eluując w dwóch etapach: najpierw 2 ml 2% kwasu mrówkowego w wodzie, a następnie 2,5 ml kwasu mrówkowego w metanolu. Eluaty zebrano w tej samej probówce i odparowano z azotem w temperaturze 40°C. Próbki rekonstruowano w 100 µl 10 mM octanu amonu (pH = 4,5).	wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas HPLC-ESI-MS/MS-MRM (Waters Alliance 2795 HPLC Separation Module, kolumna - Atlantis T3 2,1 mm x 100 mm, 3 µm)	LOQ 2.5 µmol/ L	0,99
20.	Hx	VH	Próbki przechowywano w temperaturze 4°C. Wirowano przy 3000 obr/min przez 10 min.	wysokosprawna chromatografia cieczowa z (Waters 996 PDA)	brak danych	brak danych
21.	Hx	VH (1.5 ml)	Próbkę 1,5 ml i 10 µl ISTD (5 µM) dodano do 2 ml 2 mM wodorotlenku amonu. Wytrząsano przez 1 minutę	wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową	LOD 10 µmol/ L	0.9977

Lp.	Analit	Objętość	Przygotowanie próbki	Aparatura	LOQ/ LOD	R ²
			i wirowano przy 1177 g przez 10 minut. Łącznie 2 ml supernatantu załadowano do wstępnie kondycjonowanej kasety. Kartridż Oasis MAX® kondycjonowano 2 ml MeOH i 2 ml wody dejonizowanej. Wkład przemyto 2 ml 5% wodorotlenku amonu (aq) i 2 ml 5% wodorotlenku amonu w MeOH i suszono przez 10 min. Anality eluowano 2 ml 2% kwasu mrówkowego (aq) i 2,5 ml 2% kwasu mrówkowego w MeOH. Eluat odparowano pod gazowym azotem w 40°C. Pozostałość rekonstruowano 1 ml roztworu MeOH i 0,1% kwasu mrówkowego (1:1, obj./obj.).	spektrometrią mas HPLC-ESI-MS/MS-MRM (HPLC - Agilent 1260, MS/MS - Sciex 3200 QTrap, kolumna - poroshell 120 EC-C18 2,7 μm, 4,6×50 mm, kolumna ochronna 5×2 mm)	LOQ 50 μmol/L	

1.3.4. Elektroda jonoselektywna

Elektrody jonoselektywne (*ion-selective electrodes*) należą do najstarszych czujników stosowanych w potencjometrii. W analizie potencjometrycznej dokonuje się oznaczenia stężenia substancji chemicznych w roztworach na podstawie pomiarów zmian potencjału elektrycznego [65]. Badanie takie pozwala na pomiar stężenia pożądanego jonów w obecności innych jonów, które nazywane są jonami przeszkadzającymi (interferentami). Ideę samej elektrody jonoselektywnej opracowano w 1909 roku i wykorzystywano ją wówczas w celu badania odczynu pH [65]. Natomiast analiza jonów potasu z wykorzystaniem elektrod jonoselektywnych w odniesieniu do czasu jaki upłynął od zgonu rozpoczęła się w latach sześćdziesiątych XX wieku [49].

Układ pomiarowy

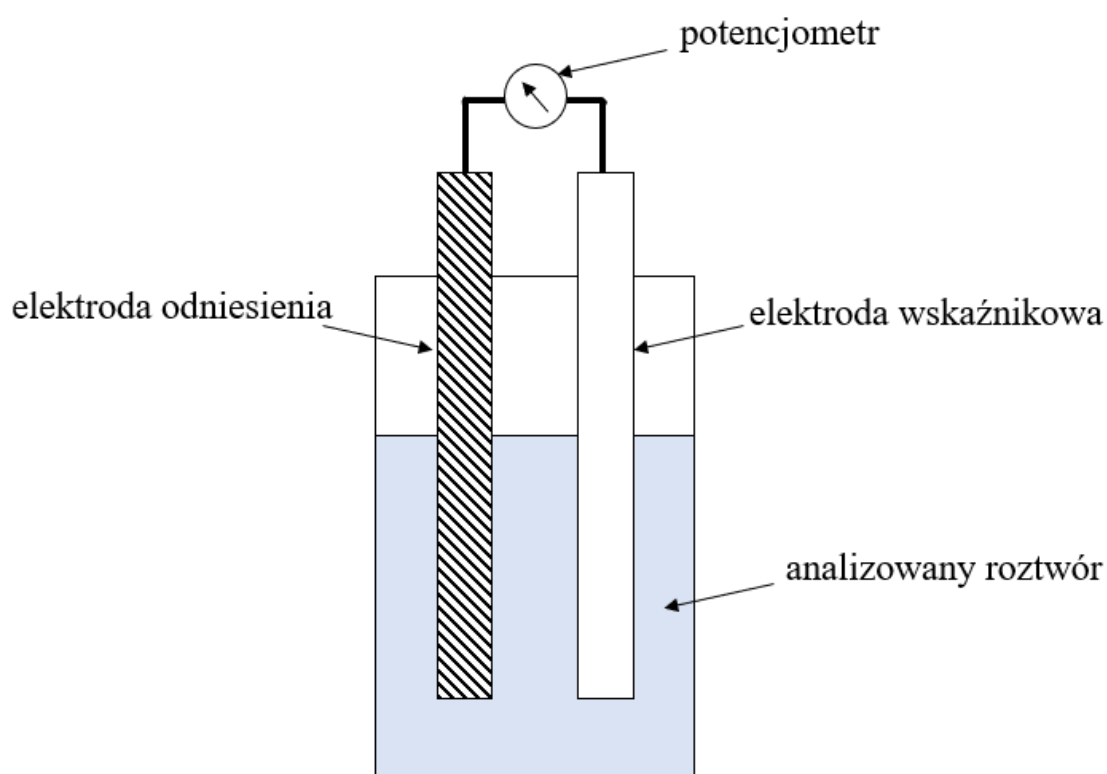
Układ pomiarowy, który służy do oznaczeń przy pomocy elektrody jonoselektywnej składa się z czterech stałych elementów (ryc. 1.6.) [66]:

- elektrody wskaźnikowej
- elektrody odniesienia

- miernika potencjału
- roztworu, w którym znajduje się badany jon

Istotną kwestią jest aby elektroda odniesienia posiadała następujące cechy:

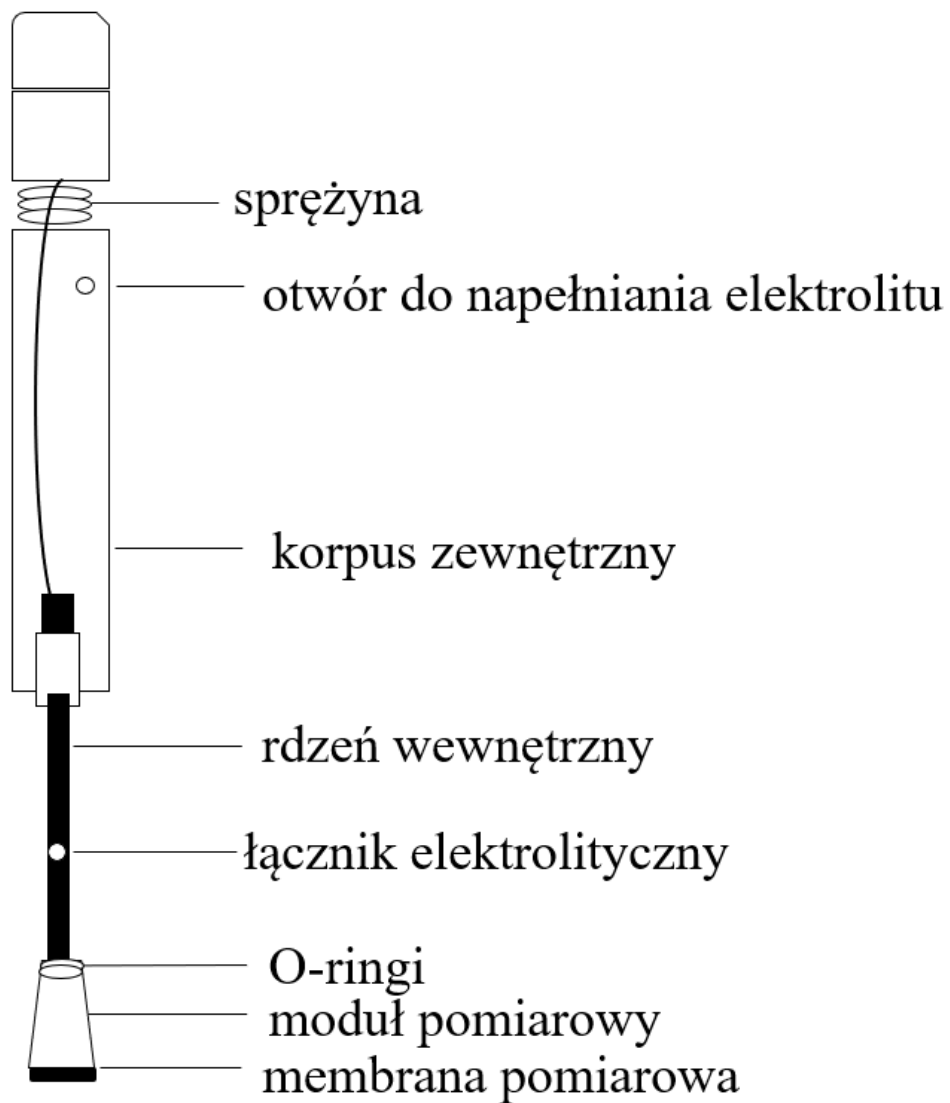
- stały i odtwarzalny potencjał, bez względu na rodzaj badanej próbki
- w miarę swobodny wypływ elektrolitu z elektrody
- brak wpływu jonów wchodzących w skład elektrolitu wewnętrznego na przebieg oznaczeń



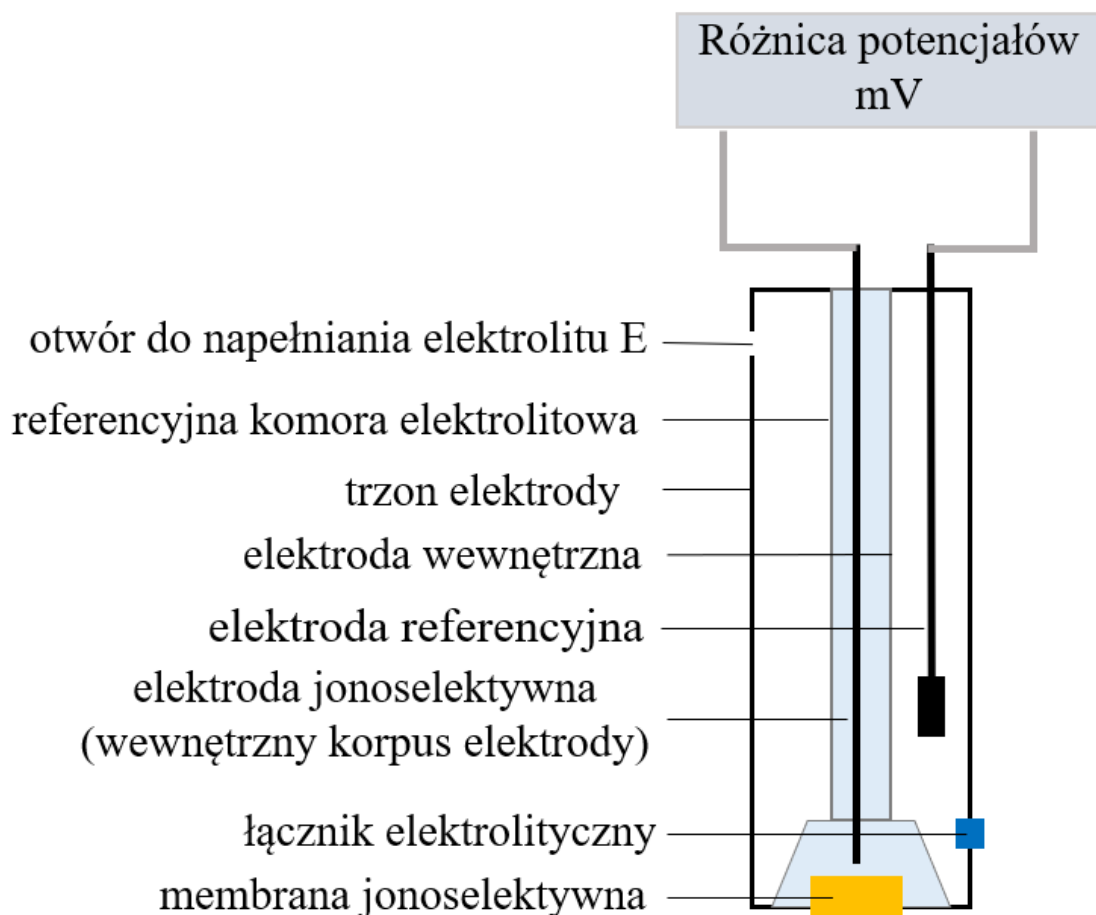
Ryc. 1.6. Układ pomiarowy do oznaczeń przy użyciu elektrody jonoselektywnej

Zróznicowane reakcje elektrochemiczne wpływają na konstrukcję elektrod jonoselektywnych, jednak są też między nimi liczne podobieństwa. Każda z elektrod jonoselektywnych posiada membranę: szklaną, krystaliczną lub plastyczną (polimerową). Membrany te oddzielają roztwór próbki od roztworu wewnętrznego, który posiada zazwyczaj te same jony, na które membrana jest wrażliwa. Każda z elektrod ma wyprowadzenie elektryczne, które jest połączone z kablem, który pozwala na podłączenie elektrody do potencjometru [65]. Podczas badań przedstawionych w niniejszej pracy użyto dwóch typów elektrod z membraną polimerową: elektrody zespolonej

(kombinowanej) (ryc. 1.7. , ryc. 1.8.) oraz elektrody jonoselektywnej wraz elektrodą odniesienia.



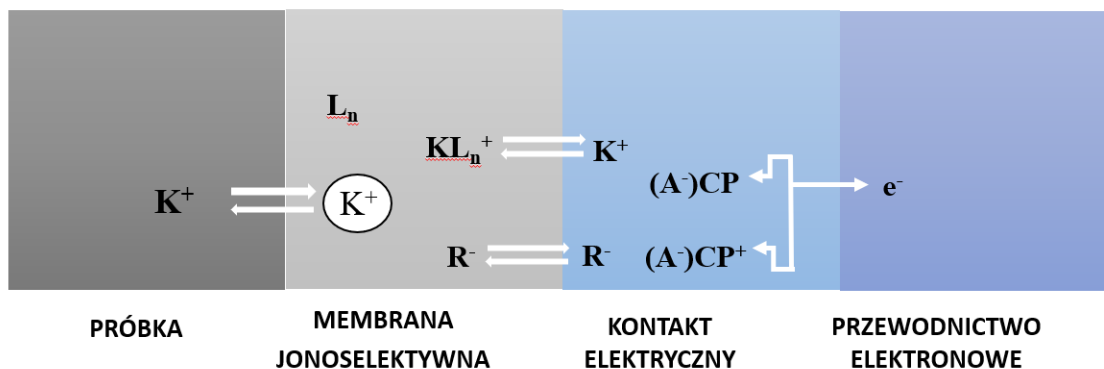
Ryc. 1.7. Schemat elektrody potasowej zespolonej (kombinowanej) przed zamontowaniem firmy Mettler-Toledo [67]



Ryc. 1.8. Ogólny schemat budowy elektrody jonoselektywnej zespolonej (kombinowanej) [68], elektrolit E – wodny roztwór chlorku sodu i azotanu srebra

Zasada działania

Zasada działania czujników elektrochemicznych opiera się na pomiarze siły elektromotorycznej ogniwa. Ogniwo to złożone jest z dwóch elektrod – elektrody wskaźnikowej oraz elektrody odniesienia, które są zanurzone w roztworze. Ten układ pomiarowy ma za zadanie przekształcić sygnał chemiczny na sygnał elektryczny, zazwyczaj w postaci prądu lub zmiany potencjału. Elektrody jonoselektywne reagują selektywnie na obecność danego jonu. Elementem, który jest charakterystyczny dla elektrod jonoselektywnych jest membrana jonowymienna. Na granicy faz membrany z roztworem dochodzi do powstania różnicy potencjałów. Różnica potencjałów jest zależna od aktywności jonu, który znajduje się zarówno w roztworze jak i w membranie. Potencjał elektryczny powstaje na skutek wymiany jonowej między roztworem a membraną (ryc. 1.9.) [65] [66].



Ryc. 1.9. Schematyczne przedstawienie mechanizmu przekształcania migracji jonów na przepływ elektronów w stałym kontakcie elektrody potasowej ISE; K^+ - jony potasu, L_n – nośnik neutralny (ligand), R^- - jon hydrofobowy o przeciwnym znaku, CP - polimer przewodzący, ewentualnie domieszkowany małym anionem (np. R^-) lub większym anionem elektrolitu (A^-) [69]

Zależność potencjału od aktywności jonów potasu w roztworze dla elektrod jonoselektywnych przedstawia równanie Nikolskiego [70]:

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{z_j F} \ln \left[a_i + \sum K_{ij} a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (1)$$

gdzie: z_i - ładunek jonu głównego, z_j - ładunek jonu interferującego, a_i - aktywność jonu głównego, a_j - aktywność jonu interferującego, K_{ij} - współczynnik selektywności.

Zastosowanie

Dzięki zastosowaniu elektrod jonoselektywnych możliwe jest oznaczenie zarówno jonów nieorganicznych jak i złożonych związków organicznych. Szerokie zastosowanie wynika z tego, że można dokonać szybkiego i bezpośredniego pomiaru. Ponadto elektrody jonoselektywne są tanie oraz proste w obsłudze. Z uwagi na powyższe cechy czujniki te znajdują szerokie zastosowanie m.in. w medycynie, biologii, ochronie środowiska czy geologii [66]. Jednym z zastosowań są pomiary w analizie klinicznej, przede wszystkim w badaniu zawartości elektrolitów w płynach ustrojowych m.in. krwi oraz moczu. Do jonów nieorganicznych, które są najczęściej analizowane zaliczamy m.in.: jony potasu,

litu, sodu oraz wapnia. Powyższe badania pozwalają na wykrycie zaburzeń elektrolitowych, a co za tym idzie wykrycie chorób lub nieprawidłowości które im towarzyszą. Badania takie stały się badaniami rutynowymi [66][70].

1.3.5. Optyczna spektrometria emisyjna

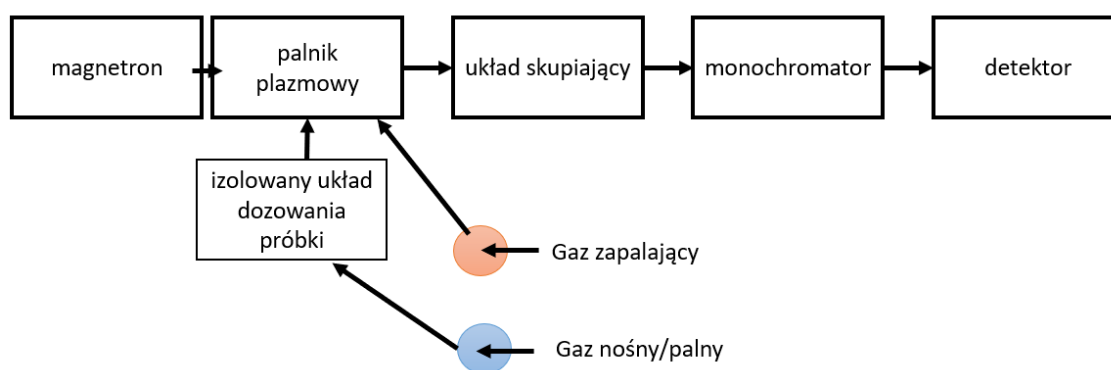
Spektroskopia jest to dziedziną analizy chemicznej, w której dokonuje się interpretacji widm emisyjnych lub absorpcyjnych uzyskiwanych w wyniku oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego na materię (zbiorowisko atomów oraz cząsteczek) [71]. Z kolei spektrometria zajmuje się pomiarami efektów wytwarzania lub oddziaływania badanego materiału z promieniowaniem elektromagnetycznym oraz ich rejestracją. Spektroskopie można podzielić na dwa rodzaje:

- spektroskopie absorpcyjną - polegającą na pochłanianiu promieniowania, które skutkuje zwiększeniem energii układu,
- spektroskopie emisyjną – polegającą na oddaniu części energii przez układ w wyniku promieniowania.

Spektroskopia jest powiązana z dwoma prawami: prawem addytywności absorbancji oraz prawem Lamberta-Beera. Prawo addytywności promieniowania traktuje o tym, że absorbancja całkowita ośrodka jest sumą absorbancji wszystkich składników znajdujących się w próbce [71]. Natomiast prawo Lamberta-Beera opisuje pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego przy przechodzeniu przez rozpraszający oraz częściowo absorbujący ośrodek.

Optyczna spektrometria emisyjna jest jedną z odmian spektroskopii, w której elektrony w badanych substancjach są wzbudzone za pomocą np. plazmy indukowanej mikrofalami (w skrócie MIP-OES, niekiedy stosowany skrót MP-AES). W MIP-OES stosowana jest bardzo wysoka temperatura (ok. 6000 °C), która pozwala na wzbudzenie pierwiastków, które mają znacznie wyższe potencjały wzbudzenia niż w przypadku klasycznej atomowej spektrometrii emisyjnej (ASE). W związku z powyższym pozwala to na analizę kilku lub kilkunastu pierwiastków w ciągu jednej analizy. Wysoka temperatura plazmy mikrofalowej - generowanej w palniku zasilanym czystym azotem - podtrzymywana jest poprzez pole mikrofalowe. Wadą MIP-OES jest fakt, że wysoka temperatura atomizacji generuje skomplikowane widma emitowane w atomizerze. W związku z powyższym

wykorzystuje się zaawansowane układy optyczne, które skupiają wiązkę promieniowania. Wiązka ta jest kierowana do monochromatora, który charakteryzuje się wysoką rozdzielczością. Aby zachować selektywność należy zastosować monochromator, który jest w stanie rozróżniać długości fal rzędu 0,01 nm, a jako detektor należy zastosować wysokorozdzielczą matrycę światłoczułą CCD. Taka technologia umożliwia oznaczenie jednocześnie szerokiej gamy pierwiastków w skomplikowanej matrycy. Jako gaz plazmowy stosuje się azot, który ogranicza ilość oznaczanych pierwiastków. Aby zminimalizować tę wadę możliwe jest zastosowanie gazu plazmowego o wyższym potencjale wzbudzenia np. argonu, wiąże się to jednak z większym wydatkiem energetycznym [71]. Poniżej przedstawiono schemat blokowy MP-AES (ryc. 1.10.).



Ryc. 1.10. Schemat blokowy MP-AES

1.4. Jony potasu w płynie oczyńnym

Metoda szacowania czasu śmierci na podstawie pomiarów stężenia jonów potasu w ciele szklistym została opracowana już w 1960 roku [34]. Zaletą tej metody jest dobrze poznany mechanizm pośmiertnego uwalniania tych jonów. Dlatego istnieje wiele publikacji opisujących korelację pomiędzy PMI a poziomami stężeń potasu. Zewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasu wzrasta wraz z zakończeniem działania pompy sodowo-potasowej, co w konsekwencji prowadzi do swobodnego wycieku jonów K^+ z komórek [25]. Potas był najczęściej stosowaną substancją endogenną do szacowania PMI, gdyż jego stężenie oznaczano w 42% analizowanych prac ($n=37$) [2], [10]–[63].

Przegląd literatury wskazuje jednak na konieczność jednoczesnej oceny różnych markerów, które są potencjalnie istotne dla oszacowania PMI. Podkreśla się, że wpływ na metodologię szacowania PMI może mieć szereg uwarunkowań, które są związane z prawidłowym pobraniem i wstępną obróbką próbki, temperaturą otoczenia, temperaturą ciała czy wiekiem zmarłego [14], [16].

1.4.1. Lateralizacja

Przegląd literatury wykazał, iż na szacowanie PMI może mieć wpływ szereg czynników, które są związane m.in. z prawidłowym pobraniem i wstępną obróbką próbki, temperaturą otoczenia, temperaturą ciała czy wiekiem zmarłego [14], [16]. Rathinam i in. [33] analizowali wpływ czynników wewnętrznych i zewnętrznych na pośmiertne stężenie jonów potasu w ciele szklistym pobranym z obu gałek ocznych. Grupę badaną stanowiło 55 zmarłych, z wyłączeniem osób z urazami głowy i chorobami oczu, których ciało szkliste nie nadawało się do analizy (mętne lub zanieczyszczone krwią). Średnie stężenia jonów potasu w prawym i lewym oku były bardzo zbliżone (odpowiednio $8,8 \pm 3,9$ mmol/l i $8,9 \pm 3,9$ mmol/l). Dlatego nie stwierdzono statystycznie istotnego efektu lateralizacji, a więc do badań w kierunku oznaczenia stężenia jonów potasu można pobierać płyn oczny zarówno z prawego jak i lewego oka.

1.4.2. Płeć

Chandrakanth [12] zbadał wpływ płci na stężenie jonów potasu. Różnice między mężczyznami i kobietami były nieistotne statystycznie. Natomiast u mężczyzn odnotowano wyższy stosunek jonów sodu do jonów potasu [12].

1.4.3. Wiek

Istnieje szereg badań oceniających stężenie potasu w ciele szklistym w odniesieniu do tej zmiennej. Cordeiro i in. [16] stwierdzili, że wiek nie ma wpływu na PMI u osób w wieku 18-97 lat, ale podkreślili, że pomiarów dokonano pierwszego dnia

po śmierci. Podobnie Jashnani [27] wykazał, że wiek nie wpływa na stężenie jonów potasu u osób w wieku od 15 do 88 lat. Z tymi doniesieniami korespondowały badania Foster [25] i Rathinama [33], chociaż badanie Foster'a nie obejmowało osób poniżej 18 roku życia. Przeciwnie, Zilg i in. [17] stwierdzili wyraźny wpływ wieku na stężenie jonów potasu w ciele szklistym młodszych osób i stwierdzili do 16% zróżnicowania między różnymi grupami wiekowymi.

1.4.4. Przyczyna zgonu

Przyczynami zgonu, które mają wpływ na pośmiertne stężenie jonów potasu w VH, są: rodzaj zgonu (np. powieszenia), śpiączka cukrzycowa i zaburzenia elektrolitowe. Podwyższone stężenie jonów potasu w przypadku powieszeń spowodowane jest zaciśnięciem pętli na szyi, co powoduje znaczny wzrost ciśnienia żylnego. Przyczyna zgonu silnie wpływa na zmianę stężenia jonów potasu po śmierci, co jest związane głównie z możliwością skażenia ciała szklistego krwią. Krążenie żyłne może prowadzić do przekrwienia naczyń włosowatych, a tym samym do zwiększenia przecieku naczyniowego z naczyń włosowatych do siatkówki [12]. Ponadto w przypadku wystąpienia kwasicy metabolicznej należy spodziewać się hiperkaliemii (nadmiarowego, dużego stężenia potasu we krwi, powyżej 5,5 mmol/l), co może uniemożliwić wiarygodne oszacowanie PMI na podstawie stężenia jonów potasu.

Znaczące różnice stężeń jonów potasu w ciele szklistym oka obserwowano w śmiertelnej śpiączce cukrzycowej. Wiadomo, że w śpiączce cukrzycowej dochodzi do uwolnienia potasu z komórki na zewnątrz w wyniku niedoboru insuliny i kwasicy [17], [72].

Każdy nagły ruch mechaniczny podczas lub po śmierci może spowodować pęknięcie naczyń krwionośnych w oczach i zmiany stężenia jonów potasu w płynie ocznym.

1.4.5. Temperatura otoczenia

Badano również zależność między temperaturą otoczenia a pośmiertnym stężeniem potasu. Zilg [17] zastosował wzór z czynnikiem temperaturowym do oceny jego wpływu na poziom stężenia potasu i stwierdził, że odpowiada on za 5 % zmienności parametrów. Rognum [34] wykazał dodatnią korelację między stężeniem potasu i hipoksantyny a temperaturą otoczenia.

1.4.6. Inne czynniki

Innymi czynnikami, które mogą wpływać na oszacowanie PMI na podstawie pomiarów K^+ w ciele szklistym, są: metoda analityczna, sposób pobierania i przechowywania próbek (omówiono w rozdziale 1.3.3.) oraz stopień rozkładu zwłok [38].

Wyjściowe stężenie jonów potasu w ciele szklistym mieści się w zakresie fizjologicznym przed śmiercią, tj. od 3,5 do 5,0 mmol/l [36]. Badania potwierdzają, że wzrost pośmiertnego stężenia jonów potasu odpowiada wzrostowi PMI [16], [32]. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia dotyczące wpływu wieku i temperatury otoczenia na stężenie jonów potasu. Zilg i in. [17] przeprowadzili badania, które dowiodły, że wzrost poziomu stężenia jonów potasu nie jest liniowy i zależy również od wspomnianych zmiennych - temperatury otoczenia i wieku. Autorzy opracowali wzór, który umożliwia obliczenie szacowanego PMI z uwzględnieniem stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka, temperaturę otoczenia oraz wiek zmarłego (<https://slbd.shinyapps.io/pmiPredictor/>). Ponadto Zilg i in. [17] stwierdzili, że po ok. 7 dniach poziom stężenia potasu osiąga równowagę i wynosi ok. 35 mmol/l. Nadal toczy się dyskusja, która metoda szacowania PMI na podstawie pomiarów stężenia jonów potasu i hipoksantyny jest bardziej precyzyjna (wartości obu parametrów wzrastają po śmierci).

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa w tabeli 1.6. zestawiono wzory regresji liniowej wyznaczone przez kilkunastu badaczy w latach 1963-2020 do oszacowania PMI na podstawie zawartości jonów potasu w ciele szklistym oka [21]–[28], [30]–[32], [36], [37], [39], [62], [63], [73]. Na ich podstawie oszacowano zakres stężeń jonów potasu $[K^+]_{\min}$ (dla PMI = 0) i maksymalnego $[K^+]_{\max}$ (koniec zakresu zastosowania PMI wyznaczonego przez autorów) (tab. 1.7.). Liczba badanych mieściła się w przedziale 32-210, obliczone zakresy średnich $[K^+]_{\min}$ i $[K^+]_{\max}$ wynosiły odpowiednio 5,23 mmol/l oraz 23,29 mmol/l.

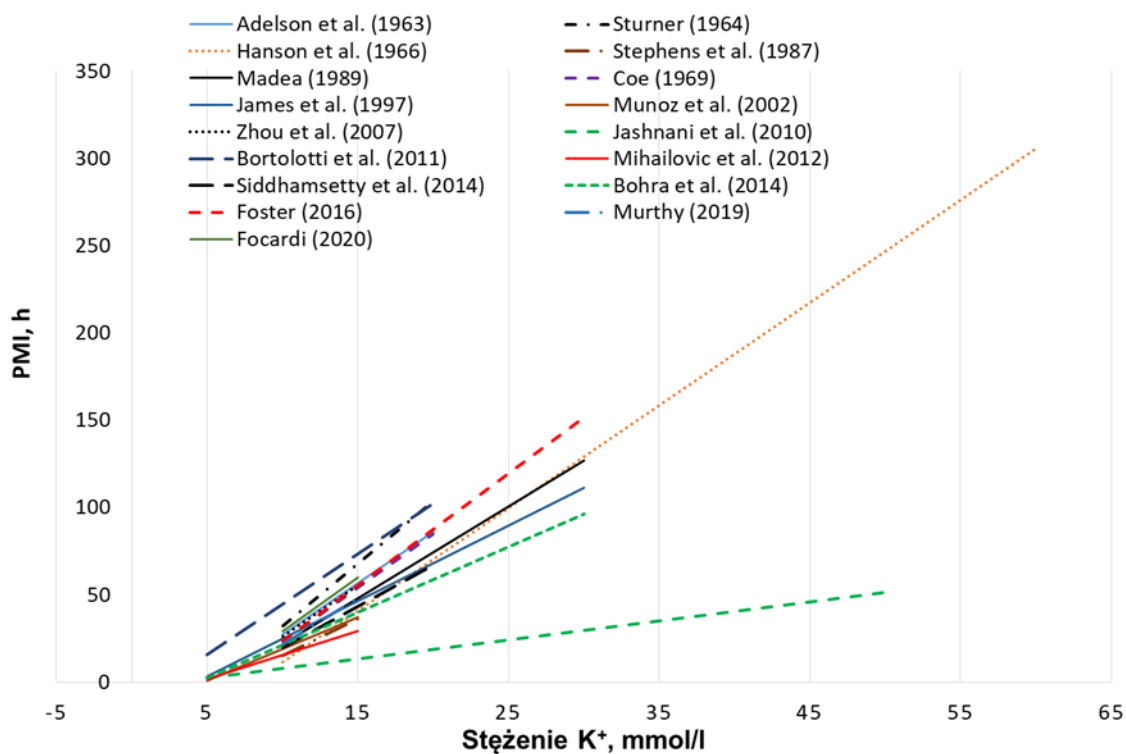
Tab. 1.6. Oszacowanie PMI na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka wg piśmiennictwa w latach 1963-2020 oka [21]–[28], [30]–[32], [36], [37], [39], [62], [63], [73]

Lp.	Autor	Ilość przypadków	Wzór	Zakres czasowy [h]
1.	Adelson et al. (1963)	209	$PMI = 5,88 [K^+] - 31,53$	21
2.	Sturner (1964)	125	$PMI = 7,14[K^+] - 39,10$	104
3.	Hanson et al. (1966)	203	$PMI = 5,88 [K^+] - 47,10$	310
4.	Stephens et al. (1987)	1427	$PMI = 4,20 [K^+] - 26,65$	35
5.	Madea (1989)	107	$PMI = 5,26[K^+] - 30,90$	34 - 120
6.	Coe (1969)	145	$PMI = 6,15[K^+] - 38,10$	100
7.	James et al. (1997)	100	$PMI = 4,32[K^+] - 18,35$	brak danych
8.	Munoz et al. (2002)	176	$PMI = 3,63[K^+] - 17,33$	1 - 29
9.	Zhou et al. (2007)	62	$PMI = 5,88[K^+] - 32,71$	1 - 27
10.	Jashnani et al. (2010)	120	$PMI = 1,08[K^+] - 2,82$	50
11.	Bortolotti et al. (2011)	164	$PMI = 5,77 [K^+] - 13,28$	2 -110
12.	Mihailovic et al. (2012)	32	$PMI = 2,75[K^+] -11,98$	3 - 30
13.	Siddhamsetty et al. (2014)	210	$PMI = 4,75[K^+] - 27,9$	72
14.	Bohra et al. (2014)	200	$PMI = 3,75[K^+] - 16,22$	brak danych
15.	Foster (2016)	78	$PMI = 6,42[K^+] - 40,94$	6 - 162
16.	Murthy (2019)	100	$PMI = 5,26 [K^+] - 30,9$	3 - 52
17.	Focardi (2020)	120	$PMI = 6,16[K^+] - 32,49$	20-72

Tab. 1.7. Współczynniki kierunkowe prostej (a), wyraz wolny (b) równań $PMI = a[K^+] + b$ wymienionych w tabeli 1.6. oraz wyznaczonych wartości minimalnego stężenia $[K^+]_{min}$ (dla $PMI=0$) i maksymalnego stężenia $[K^+]_{max}$ (dla PMI końca zakresu czasowego zastosowania równania).

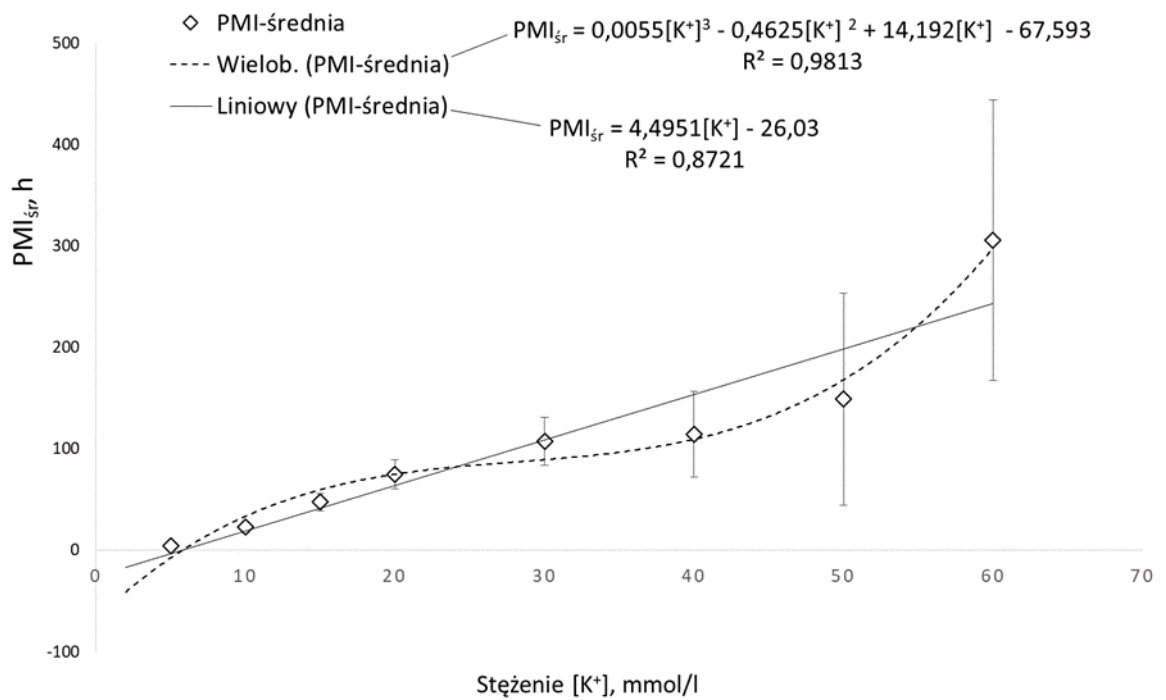
Lp.	Autor	a	b	PMI końca zakresu [h]	$[K^+]_{min}$, mmol/l (dla $PMI=0$)	$[K^+]_{max}$, mmol/l ($PMI=$ maksymalne)
1.	Adelson et al. (1963)	5,88	-31,53	21	5,36	8,93
2.	Sturner (1964)	7,14	-39,10	104	5,48	20,04
3.	Hanson et al. (1966)	5,88	-47,10	310	8,01	60,73
4.	Stephens et al. (1987)	4,20	-26,65	35	6,35	14,68
5.	Madea (1989)	5,26	-30,90	120	5,87	28,69
6.	Coe (1969)	6,15	-38,10	100	6,20	22,46
7.	James et al. (1997)	4,32	-18,35	brak danych	4,25	brak danych
8.	Munoz et al. (2002)	3,63	-17,33	29	4,77	12,76
9.	Zhou et al. (2007)	5,88	-32,71	27	5,56	10,15
10.	Jashnani et al. (2010)	1,08	-2,82	50	2,61	48,91
11.	Bortolotti et al. (2011)	5,77	-13,28	110	2,30	21,37
12.	Mihailovic et al. (2012)	2,75	-11,98	30	4,36	15,27
13.	Siddhamsetty et al. (2014)	4,75	-27,90	72	5,87	21,03
14.	Bohra et al. (2014)	3,75	-16,22	brak danych	4,33	brak danych
15.	Foster (2016)	6,42	-40,94	162	6,38	31,61
16.	Murthy (2019)	5,26	-30,90	52	5,87	15,76
17.	Focardi (2020)	6,16	-32,49	72	5,27	16,96
n		17	17	15	17	15
minimum		1,08	-2,82	21,00	2,30	8,93
maksimum		7,14	-47,10	310,00	8,01	60,73
średnia		4,96	-26,96	86,27	5,23	23,29
mediana		5,26	-30,90	72,00	5,48	20,04

Graficzną reprezentacją zależności PMI w funkcji stężenia jonów potasu w płynie z gałki ocznej (17 wzorów podanych w tabeli 1.6.) przedstawiono poniżej na rycinie 1.11.



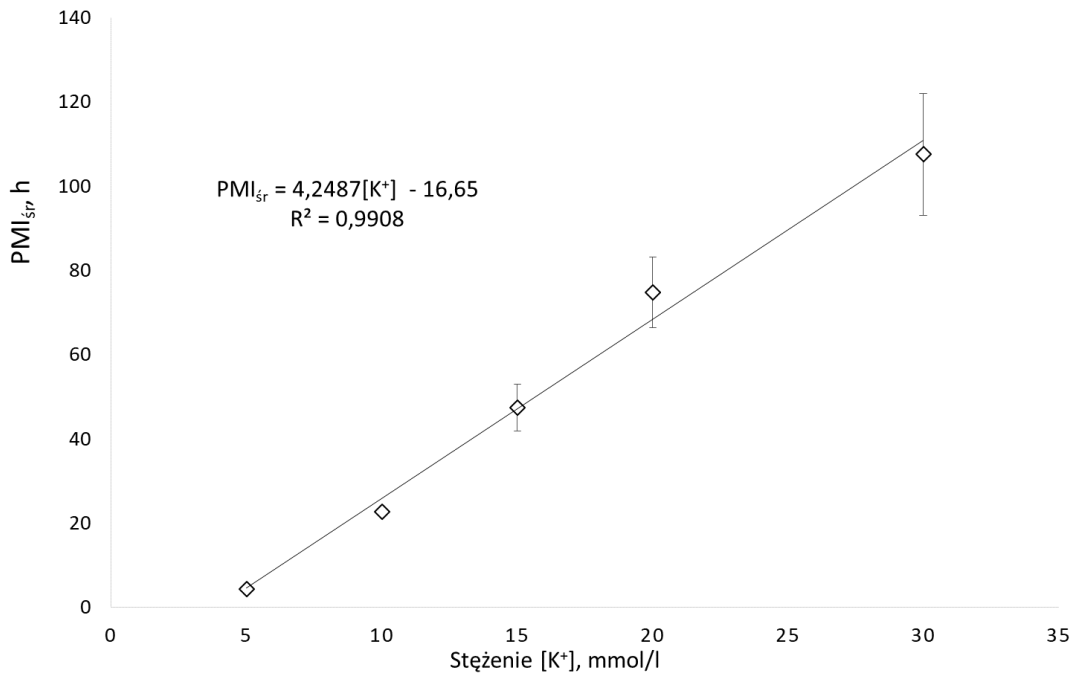
Ryc. 1.11. Równania regresji liniowej PMI w funkcji stężenia jonów potasu w cieleszklistym oka na podstawie danych z tabeli 1.6.

Na podstawie siedemnastu wzorów zawartych w tabeli 1.6. wyznaczono średnie wartości PMI_{sr} i odpowiadające im odchylenia standardowe, co następnie umożliwiło wyznaczenie średniej zależności liniowej PMI_{sr} (linia przerywana, $R^2 = 0,8721$) oraz wielomianowej zależności krzywoliniowej wielomianowej PMI_{sr} (ciągła linia, $R^2 = 0,9813$) (ryc. 1.12.).



Ryc. 1.12. Średnie wartości PMI (na podstawie tabeli 1.6.) wraz z wyznaczonymi odchyleniami standardowymi i korelacji liniowej (linia ciągła) i wielomianowej (linia kreskowana) [21]–[28], [30]–[32], [36], [37], [39], [62], [63], [73]

Analiza wyników zawartych w tabeli 1.7. wraz z graficzną ilustracją podaną na rycinach 1.11 i 1.12 dowodzi, iż zakres użyteczny stężeń jonów potasu w kontekście szacowania PMI jest dość wąski i wynosi od ok. 5 mmol/l do ok. 30 mmol/l (ryc. 1.13.).



Ryc. 1.13. Średnie wartości PMI (na podstawie danych z tabeli 1.7.) wraz z wyznaczonymi odchyleniami standardowymi i korelacji liniowej (linia ciągła) w zakresie stężeń jonów K⁺ 5-30 mmol/l

Cordeiro i in. [16] zaproponowali wzory, które miały służyć do oszacowania PMI na podstawie wartości kilku parametrów: stężenia jonów potasu, hipoksantyny i mocznika, temperatury w odbyciu, temperatury otoczenia i masy ciała. Autorzy wykorzystali uogólniony model addytywny (*Generalized Additive Model, GAM*) stosowany w statystyce do opisu zależności między zmiennymi niezależnymi a zmienną zależną, przy czym mogą one mieć charakter nieliniowy oraz niejednorodną wariancję. Według Cordeiro i in. [16] masa ciała ma znaczący wpływ na wychłodzenie zwłok, a tym samym na szacowany PMI. Rathinam i in. [33] badali próbki ciała szklistego do 40 godzin po śmierci. Największy wzrost stężenia obserwowano między 24 a 40 godziną po śmierci. Po 40 h stężenie jonów potasu zaczęło spadać. Autorzy zdecydowali się wykorzystać tylko próbki pobrane z prawego oka, ponieważ nie ma statystycznej różnicy między prawym a lewym okiem. Jashnani i in. [27] badali poziomy jonów potasu w ciele szklistym do 50 h po śmierci. Pośmiertne stężenie K⁺ mieściło się w zakresie 4,80 - 45,60 mmol/l i wykazywało dodatnią korelację liniową z PMI, zwłaszcza w pierwszych 20 h po śmierci.

1.5. Niepewność pomiarowa

Niepewność pomiarowa jest liczbowo wyrażonym rozrzutem wielkości mierzonej, w którym z pewnym prawdopodobieństwem oczekuje się znalezienia prawdziwej wartości pomiarowej. Niepewność pomiarowa wskazuje, iż uzyskany wynik pomiaru może się różnić od rzeczywistej wartości mierzonej wielkości, co wynika z ograniczeń technicznych, niedoskonałości przyrządów pomiarowych oraz innych czynników analitycznych i pozanalitycznych wpływających na dokładność pomiaru. Niepewność pojedynczego pomiaru (składowa niepewności) na urządzeniu pomiarowym jest to składowa niepewności wszystkich pojedynczych etapów w trakcie postępowania analitycznego [74]. Najczęściej niepewność pomiarowa jest utożsamiana i kojarzona z błędem pomiarowym, jednak słowo „błąd” jest często kojarzone pejoratywnie jako „błędne postępowanie”, co wynika z niezrozumienia pojęć, gdyż niepewności pomiarowej nie sposób jest uniknąć. Jest ona immanentną cechą każdego pomiaru na urządzeniu pomiarowym. Na składowe niepewności pomiarowej mają wpływ m.in.: dokładność i precyzja przyrządu pomiarowego, błędy systematyczne (występują w stałym kierunku i mogą wynikać z rozkalibrowania urządzenia pomiarowego), warunki środowiskowe (czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura, wilgotność, ciśnienie atmosferyczne), niedoskonałość procedury pomiarowej.

Niepewność pomiaru można wyznaczyć przy pomocy dwóch metodyk określanych metodą typu A oraz metodą typu B [75]. Metoda typu A najczęściej wykorzystuje serię pomiarów i określa rozrzut wyników (np. jako odchylenie standardowe), uwzględniając współczynnik rozszerzenia równy 2 i odpowiadający mu przedział ufności dla prawdopodobieństwa 95%. Metoda typu A wyznaczania niepewności standardowej znajduje swoje zastosowanie, gdy istnieje możliwość przeprowadzenia wielu niezależnych obserwacji jednej z wielkości wejściowych w takich samych warunkach pomiarowych. Metoda typu B wyznaczania niepewności standardowej jest metodą, w której wyznacza się niepewność w oparciu o innego rodzaju przesłanki naukowe niż eksperymentalne, do których zaliczamy m.in. [75]:

- specyfikacje producenta danej aparatury
- dane uzyskane z wcześniej przeprowadzonych badań

- dane uzyskane ze świadectw wzorcowania oraz certyfikatów
- znajomość właściwości materiałów i przyrządów pomiarowych niepewności uzyskane z wiarygodnych źródeł, m.in. z podręczników, publikacji naukowych.

Według GUM (Głównego Urzędu Miar) najczęściej aby oszacować niepewność pomiarową należy [76]:

- zdefiniować wielkość oznaczaną (mezurand), obiekt badany (np. płyn biologiczny) oraz procedurę pomiarową;
- opracować matematyczny model, który posłuży do obliczenia wyniku analizy na podstawie mierzonych parametrów;
- zastosować np. prawo propagacji niepewności do obliczenia całkowitej standardowej niepewności wyniku analizy;
- zaprezentować wynik końcowy analizy w postaci wynik przedziału +/- rozszerzona niepewność.

Przykładowy wzór na niepewność rozszerzoną typu B wykorzystujący prawo propagacji niepewności może przyjąć następującą postać:

$$U = k \cdot C_m \sqrt{\sum \left(\frac{u_p}{v}\right)^2 + \sum \left(\frac{u_d}{v}\right)^2} \quad (2)$$

gdzie:

U - niepewność pomiaru typu B,

$k = 2$ (prawdopodobieństwo 95%),

C_m – stężenie potasu,

u_p - niepewność precyzji pomiarowej,

u_d - niepewność dokładności pomiarowej,

V – objętość próbki.

Cechą odróżniającą metodę typu B od metody typu A jest w przypadku metody B brak konieczności przeprowadzania badań eksperymentalnych w celu oszacowania

niepewności. Często obie wartości oszacowań typu A i B są w praktyce sumowane, jeśli nie zachodzi ryzyko znaczącego powtarzania się tych samych składowych niepewności. Zapewnienie powtarzalności wyników w pomiarach biomedycznych jest trudne do realizacji. Z technicznego punktu widzenia urządzenie pomiarowe może być źródłem powtarzalnych wyników o charakterze losowym, natomiast obiekt badań (np. ciało szkliste oka) podlega zmiennym trudnym do przewidzenia na etapie przedanalizycznym (niepowtarzalne pobranie materiału biologicznego w trakcie sekcji zwłok) czy postanalizycznym związanym z błędami obliczeniowymi i interpretacyjnymi.

2. Cel pracy

Celem pracy było stworzenie algorytmu postępowania umożliwiającego oszacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka z uwzględnieniem niepewności pomiarowej dla potrzeb medycyny sądowej.

Cel był realizowany w następujących etapach i zakresie:

- a) przegląd piśmiennictwa w zakresie metod biochemicznych stosowanych w medycynie sądowej do szacowania czasu zgonu, a w szczególności dotyczących wyboru analitu (biomarkera PMI), rodzaju sekcyjnego materiału biologicznego oraz metody analizy chemicznej;
- b) pobieranie próbek ciała szklistego oka w trakcie sądowo-lekarskich sekcji zwłok przeprowadzanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz gromadzenie informacji na temat okoliczności zgonów (m.in. płeć, wiek, czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia - PMI_{okol} , prawdopodobna przyczyna zgonu);
- c) optymalizacja i walidacja kluczowych parametrów procedury pobierania i przechowywania ciała szklistego oka (etap przedanalizy) oraz analizy instrumentalnej (etap analityczny) metodą ISE;
- d) oszacowanie niepewności pomiarowej typu A i B dla oznaczania stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka metodą potencjometryczną z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej (ISE) oraz porównawczo metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z atomizacją w plazmie indukowanej mikrofalowo (MIP-OES);
- e) próba oszacowania zależności PMI w funkcji stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka dla zgromadzonych przypadków zgonów dla kategorii płci, wieku oraz prawdopodobnej przyczyny zgonu.

3. Materiał i metody

3.1. Pobranie materiału

Materiał badawczy stanowiło ciało szkliste oka, pobierane w trakcie sekcji zwłok w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2020-2023 za zgodą komisji bioetycznej (Uchwała nr NKBBN/18/2020 Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym z dnia 28.02.2020 r.). Zgromadzono próbki pochodzące od 94 denatów.

Po pobraniu próbki ciała szklistego oka (VH) przeniesiono do 2 ml probówek typu Eppendorf i jednoznacznie oznakowano numerem sekcji zwłok. Następnie zebrane próbki VH odwirowano wkrótce po wypreparowaniu, przez 10 min przy 3500 obr./min, supernatant przeniesiono do 2 ml fiolek Eppendorf, które następnie przechowywano w temperaturze -20 °C do czasu analizy. W tabeli 3.1 zestawiono dane zmarłego: płeć, wiek zgonu, zawartość alkoholu we krwi i innych materiałów biologicznych, przyczynę zgonu, TOD lub ujawnienie ciała oraz czas sekcji zwłok. Od zgonu do sekcji zwłok czas zwykle nie przekraczał kilku dni. W okresie poprzedzającym sekcje, zwłoki przechowywano w temperaturze +4 °C.

Tab. 3.1. Wybrane dane osób zmarłych poddanych sekcji zwłok w latach 2020–2023 w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed; objaśnienia: ¹ nie badano materiału na zawartość alkoholu, † – znany czas zgonu, ⌚ - znany czas ujawnienia zwłok

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (%)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
1	315/20	M	40	zgon z przyczyn chorobowych	brak ¹	6 czerwca 2020 19:47 (†)	8 czerwca 2020 12:00	40
2	375/20	K	70	zgon z przyczyn chorobowych	brak	3 lipca 2020 14:40 (†)	10 lipca 2020 08:00	161
3	389/20	M	21	porażenie prądem elektrycznym	brak	17 lipca 2020 16:38 (⌚)	27 lipca 2020 10:30	234
4	392/20	M	39	powieszenie	3,18 (krew), 3,77 (mocz)	19 lipca 2020 21:20 (⌚)	21 lipca 2020 09:00	36
5	396/20	M	19	upadek z wysokości	brak	20 lipca 2020 10:30 (⌚)	23 lipca 2020 08:00	70
6	399/20	M	42	uraz głowy	brak	22 lipca 2020 18:40 (⌚)	24 lipca 2020 10:30	59
7	405/20	M	28	upadek z wysokości	brak	24 lipca 2020 14:10 (†)	29 lipca 2020 09:00	115
8	409/20	M	50	zgon z przyczyn chorobowych	brak	26 lipca 2020 05:35 (⌚)	30 lipca 2020 08:00	98
9	412/20	M	32	powieszenie	0,69 (krew), 0,22 (mocz)	26 lipca 2020 22:30 (†)	28 lipca 2020 09:30	35
10	418/20	M	32	powieszenie	brak	28 lipca 2020 16:15 (⌚)	4 sierpnia 2020 09:00	161
11	429/20	K	58	wyniszczenie, nadużywanie alkoholu, możliwe zaburzenia metaboliczne i gospodarki kwasowo-zasadowej	brak	3 sierpnia 2020 13:00 (⌚)	7 sierpnia 2020 12:00	95
12	431/20	M	67	zgon z przyczyn chorobowych	brak ¹	30 lipca 2020 00:05 (†)	12 sierpnia 2020 08:00	320
13	438/20	M	63	zgon z przyczyn chorobowych	brak	6 August 2020 19:25 (†)	10 sierpnia 2020 10:30	87

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
14	454/20	M	71	powieszenie	brak	8 sierpnia 2020 07:40 (☞)	19 sierpnia 2020 09:00	49
15	474/20	K	65	zgon z przyczyn chorobowych	brak	27 sierpnia 2020 10:00 (nieczytelne)	1 września 2020 08:30	119
16	477/20	M	52	zgon z przyczyn chorobowych	brak	29 sierpnia 2020 06:30 (☞)	3 września 2020 09:30	123
17	499/20	M	70	zgon z przyczyn chorobowych	brak	5 września 2020 19:40 (☞)	10 września 2020 12:30	113
18	510/20	M	20	nie ustalono	brak	13 września 2020 09:25 (☞)	16 września 2020 09:30	72
19	513/20	M	54	zgon z przyczyn chorobowych	brak	14 września 2020 15:30 (☞)	16 września 2020 10:30	43
20	514/20	M	42	zgon z przyczyn chorobowych	brak	14 września 2020 11:00 (☞)	16 września 2020 09:15	46
21	515/20	M	55	zgon z przyczyn chorobowych	brak	15 września 2020 01:10 (☞)	17 września 2020 09:00	56
22	520/20	M	37	zgon z przyczyn chorobowych	brak	16 września 2020 22:20 (☞)	21 września 2020 09:00	107
23	530/20	M	26	wypadek drogowy	1,15 (krew)	19 września 2020 09:50 (☞)	23 września 2020 10:00	96
24	533/20	M	46	zgon z przyczyn chorobowych	2,82 (krew), 4,15 (mocz)	20 września 2020 04:00 (☞)	24 września 2020 08:30	100
25	538/20	M	56	powieszenie	brak	19 września 2020 20:40 (☞)	23 września 2020 08:30	84
26	566/20	M	63	zgon z przyczyn chorobowych	brak	4 października 2020 12:10 (☞)	7 października 2020 09:00	69

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
27	567/20	M	19	wypadek drogowy	brak	5 października 2020 18:20 (†)	8 października 2020 10:30	64
28	569/20	M	49	zgon z przyczyn chorobowych	brak	5 października 2020 15:00 (☞)	8 października 2020 08:30	65
29	593/20	M	66	zgon z przyczyn chorobowych	0,59 (krew), 0,40 (mocz)	15 października 2020 21:30 (☞)	22 października 2020 11:30	158
30	600/20	M	29	powieszenie	brak	18 października 2020 14:25 (☞)	20 października 2020 09:30	43
31	615/20	M	57	zgon z przyczyn chorobowych	brak	25 października 2020 18:00 (☞)	27 października 2020 10:00	40
32	733/20	K	61	zgon z przyczyn chorobowych	brak	13 grudnia 2020 (☞)	17 grudnia 2020 08:30	104
33	219/21	K	58	nie ustalono	brak	18 kwietnia 2021 14:45 (☞)	20 kwietnia 2021 09:30	43
34	225/21	K	50	wykrwawienie z głębokiej rany ciętej lewego dołu łokciowego	2,62 (krew), 2,57 (mocz)	21 kwietnia 2021 15:05 (☞)	23 kwietnia 2021	42
35	227/21	M	71	zamknięciem światła dróg oddechowych (tchawica oraz oskrzela główne) przez duże kęsy pokarmowe	2,13 (krew), 2,90 (mocz)	22 kwietnia 2021 21:30 (☞)	26 kwietnia 2021 09:00	83
36	308/21	K	47	powieszenie	1,14 (krew), 1,78 (mocz)	1 czerwca 2021 22:40 (☞)	7 czerwca 2021 09:00	130
37	317/21	M	58	powieszenie	1,96 (krew), 2,45 (mocz)	6 czerwca 2021 14:40 (☞)	8 czerwca 2021 09:00	42
38	545/21	M	67	zgon z przyczyn chorobowych	brak	28 września 2021 05:38 (†)	6 października 2021 09:00	195
39	563/21	K	99	zgon z przyczyn chorobowych	brak	10 października 2021 11:55 (†)	14 października 2021 08:15	92

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
40	602/21	M	30	upadek z wysokości	brak	26 października 2021 (☞)	3 października 2021 08:00	200
41	604/21	K	73	hipotermia	brak	25 października 2021 15:20 (☞)	15 listopada 2021 08:00	497
42	608/21	M	32	zatrucie azotynem sodu	brak	28 października 2021 (☞)	2 listopada 2021 10:30	131
43	616/21	M	67	zgon z przyczyn chorobowych	brak	31 października 2021 14:45 (†)	3 listopada 2021 11:00	68
44	617/21	M	34	nie ustalono	brak	1 listopada 2021 12:20 (☞)	4 listopada 2021 10:00	70
45	626/21	M	42	ostra niewydolność krążeniowo – oddechowa, nadużycie alkoholu, zaawansowane zmiany w wątrobie i trzustce.	3,55 (krew), 3,48 (mocz)	4 listopada 2021 11:30(☞)	9 listopada 2021 08:15	117
46	630/21	M	45	powieszenie	0,33 (krew), 0,56 (mocz)	7 listopada 2021 12:30 (☞)	10 listopada 2021 08:15	68
47	631/21	M	49	powieszenie	brak	7 listopada 2021 13:20 (☞)	10 listopada 2021 08:15	67
48	660/21	M	brak	wykrwawienia się z głębokiej rany ciętej szyi, z uszkodzeniem tętnicy szyjnej zewnętrznej,	2,34 (krew), 3,07 (mocz)	19 listopada 2021 (☞)	21 listopada 2021	48
49	80/22	M	43	porażenie prądem elektrycznym	0,41 (krew), 1,19 (mocz)	3 lutego 2022 11:00 (☞)	11 lutego 2022 09:30	191
50	94/22	M	34	zgon z przyczyn chorobowych	brak	10 lutego 2022 (☞)	14 lutego 2022 09:00	105
51	99/22	M	34	utonięcie	brak	16 lutego 2022 06:40 (☞)	18 lutego 2022 10:15	52
52	100/22	M	20	upadek z wysokości	4,87 (krew), 1,66 (mocz)	19 lutego 2022 20:40 (☞)	2 lutego 2022 09:00	60
53	101/22	M	58	zgon z przyczyn chorobowych	1,23 (krew), 1,52 (mocz)	20 lutego 2022 10:55 (☞)	22 lutego 2022	46

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
54	105/22	M	54	krwawienie z trzech ran tłuczonych powłok głowy	brak	22 lutego 2022 14:40 (☞)	25 lutego 2022 10:15	68
55	134/22	M	40	zgon z przyczyn chorobowych	brak	10 marca 2022 16:22 (☞)	15 marca 2022 09:00	113
56	136/22	M	50	zgon z przyczyn chorobowych	brak	11 marca 2022 (☞)	14 marca 2022 09:00	81
57	180/22	M	65	nadużycie alkoholu etylowego z przewlekłymi, zaawansowanymi zmianami chorobowymi w układzie sercowo-naczyniowych i w płucach	2,96 (krew), 3,47 (mocz)	2 kwietnia 2022 (☞)	5 kwietnia 2022 08:00	80
58	185/22	M	35	zgon z przyczyn chorobowych	0,26 (krew), 0,4 (mocz)	5 kwietnia 2022 10:00 (☞)	8 kwietnia 2022 08:00	70
59	187/22	M	22	nie ustalono	brak	5 kwietnia 2022 12:30 (☞)	8 kwietnia 2022 09:30	69
60	210/22	M	18	upadek z wysokości	brak	13 kwietnia 2022 23:33 (☞)	15 kwietnia 2022 09:00	34
61	220/22	K	16	powieszenie	brak	20 kwietnia 2022 20:00 (☞)	22 kwietnia 2022 08:30	36
62	290/22	M	22	zamknięcia światła dróg oddechowych przez zaaspirowaną w czasie wymiotów zawartość żołądka	brak	28 maja 2022 (☞)	2 czerwca 2022 08:30	128
63	293/22	M	28	liczne, rozległe, głębokie rany szyi	0,96 (krew), 1,35 (mocz)	31 maja 2022 00:00 (☞)	2 czerwca 2022 09:30	58
64	295/22	K	71	wypadek drogowy	brak	1 czerwca 2022 10:00 (☞)	2 czerwca 2022 11:00	25
65	352/22	M	21	porażenie prądem elektrycznym	1,01 (krew) 1,01 (mocz)	1 lipca 2022 02:00 (☞)	5 lipca 2022 10:00	104
66	365/22	M	15	uduszenie się wskutek zamknięcia światła dróg oddechowych przez zaaspirowaną w czasie wymiotów zawartość żołądka	brak	13 lipca 2022 08:20 (☞)	15 lipca 2022 09:00	49

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
67	372/22	M	64	nie ustalono	brak	18 lipca 2022 15:30 (☞)	21 lipca 2022 09:00	65
68	374/22	K	42	powieszenie	4,77 (krew), 4,19 (mocz)	19 lipca 2022 18:40 (☞)	22 lipca 2022 10:30	64
69	425/22	K	56	nie ustalono	brak	8 sierpnia 2022 (☞)	10 sierpnia 2022 08:00	56
70	436/22	M	71	zgon z przyczyn chorobowych	brak	16 sierpnia 2022 19:38 (☞)	18 sierpnia 2022 09:30	38
71	438/22	K	43	uduszenie się w następstwie zamknięcia otworów oddechowych	0,24 (krew), 0,40 (mocz)	16 sierpnia 2022 (☞)	18 sierpnia 2022 09:30	58
72	459/22	K	68	uduszenie się w następstwie zamknięcia otworów oddechowych	brak	26 sierpnia 2022 (☞)	31 sierpnia 2022 08:00	128
73	494/22	M	45	zatrucie alkoholem etylowym	3,24 (krew), 3,72 (mocz)	12 września 2022 07:00 (☞)	14 września 2022 08:30	50
74	555/22	M	58	utonięcie	0,51 (krew), 0,79 (mocz)	8 października 2022 16:10 (☞)	10 października 2022 09:00	41
75	575/22	M	63	zgon z przyczyn chorobowych	brak	17 października 2022 12:04 (☞)	20 października 2022 09:30	69
76	587/22	M	37	wykrwawienia się z uszkodzonej w dniu rany ciętej przedramienia prawego żyły odpromieniowej	brak	25 października 2022 11:30 (☞)	28 października 2022 09:30	70
77	604/22	M	84	upadek z wysokości	brak	5 listopada 2022 11:39 (☞)	8 listopada 2022 11:15	72
78	606/22	M	32	powieszenie	brak	5 listopada 2022 21:22 (☞)	8 listopada 2022 11:15	61
79	614/22	M	46	ostre zatrucie alkoholem etylowym	4,89 (krew), 5,83 (mocz)	8 listopada 2022 19:50 (☞)	10 listopada 2022 09:30	38
80	643/22	K	19	wypadek drogowy	brak	23 listopada 2022 04:55 (☞)	24 listopada 2022 09:30	29
81	646/22	M	45	zgon z przyczyn chorobowych	brak	23 listopada 2022 02:35 (☞)	25 listopada 2022 09:30	55

Lp.	SL	Płeć	Wiek	Możliwa przyczyna zgonu	Stężenie etanolu (‰)	Data zgonu/data ujawnienia	Data sekcji	PMI (h)
82	655/22	M	44	ostre zatrucie lekami	0,49 (mocz)	26 listopada 2022 (☞)	1 grudnia 2022 09:30	130
83	676/22	M	36	przyczyna nieznana	1,95 (krew) 2,59‰ (mocz)	7 grudnia 2022 07:30 (☞)	9 grudnia 2022 09:30	50
84	009/23	M	30	powieszenie	brak	3 stycznia 2023 08:00 (☞)	5 stycznia 2023 09:00	49
85	16/23	M	26	powieszenie	brak	5 stycznia 2023 (☞)	10 stycznia 2023 11:15	109
86	86/23	K	86	powieszenie	brak	12 lutego 2023 (☞)	15 lutego 2023 10:15	82
87	91/23	M	21	ostre zatrucie środkami odurzającymi	brak	13 lutego 2023 18:15 (☞)	16 lutego 2023 10:00	64
88	102/23	M	51	zgon z przyczyn chorobowych	0,26(krew), 0,25(mocz)	18 lutego 2023 08:15 (☞)	24 lutego 2023 10:15	146
89	114/23	M	48	zgon z przyczyn chorobowych	brak	22 lutego 2023 09:00 (☞)	24 lutego 2023 08:00	47
90	118/23	M	68	zgon z przyczyn chorobowych	brak	26 lutego 2023 07:00 (☞)	1 marca 2023 08:30	74
91	121/23	M	30	powieszenie	0,58 (krew), 0,24 (mocz)	28 lutego 2023 (☞)	8 marca 2023 10:15	202
92	131/23	K	50	upadek z wysokości	brak	6 marca 2023 12:50 (☞)	9 marca 2023 08:30	68
93	133/23	M	46	powieszenie	2,98(krew),2,29 (mocz)	7 marca 2023 (☞)	10 marca 2023 10:15	82
94	153/23	M	28	ostre zatrucie alkoholem etylowym	4,16(krew), 5,43 (mocz)	18 marca 2023 23:40 (☞)	22 marca 2023 08:40	81

3.2. Metody analityczne

Pomiary przeprowadzono przy pomocy dwóch metod: potencjometrycznej elektrody jonoselektywnej (*ion-selective electrode*, ISE) oraz optycznej spektrometrii emisyjnej sprzężonej z plazmą indukowaną mikrofalowo (*microwave-induced plasma - optical emission spectrometry*, MIP-OES).

Do pomiarach potencjometrii ISE wykorzystano trzy handlowo dostępne elektrody jonoselektywne: HI1414 firmy Hanna Instruments (elektroda zespolona), perfectION comb K firmy Mettler Toledo (elektroda zespolona) oraz elektrodę potasową typu 19-35 firmy MARAT (elektroda pomiarowa wraz z elektrodą odniesienia). Do odczytu pomiarów wykorzystano pehametr firmy Mettler Toledo (S220, Mettler Toledo SevenCompact) (tab. 3.2.).

W metodzie spektrometrycznej MIP-OES zastosowano urządzenie Agilent 4210 MP-AES, a mineralizacje wykonano aparatem Multiwave GO Plus firmy Anton Paar.

Tab. 3.2. Porównanie specyfikacji elektrod ISE zastosowanych w pracy doktorskiej

Nazwa elektrody Parametr	MARAT typ 19-35	Hanna Instruments H1414	Mettler Toledo perfectION comb K
Typ	Jonoselektywna i referencyjna kalomelowa	Jonoselektywna zespolona (kombinowana)	Jonoselektywna zespolona (kombinowana)
Zakres wykrywanych stężeń	10^{-1} - 10^{-6} mol/l K^{+}	mol/l do 1×10^{-6} M, 39 100 do 0.039 ppm	1×10^{-6} mol/l do 1 mol/l 0.04 mg/l do 39 000 mg/l
Zakres temperaturowy	Od 0 do 40 °C	Od 0 do 40 °C	Od 0 do 40 °C
Zakres dopuszczalnego pH	4 -10	1.5 - 12.0	2.5 – 11
Jony interferujące	Na^{+} - $1,1 \cdot 10^{-4}$ NH_4^{+} - $1,3 \cdot 10^{-2}$ Li^{+} - $7,6 \cdot 10^{-5}$ Rb^{+} - 2,1 Cs^{+} - $9,2 \cdot 10^{-2}$ H^{+} - $3,9 \cdot 10^{-4}$	10 dla Na^{+} 300 dla Li^{+} 2000 dla NH_4^{+} 2000 dla Ca^{+}	H^{+} , OH^{-}
Oporność elektrody	max. 1 MΩ	Brak informacji	Poniżej 50 MΩ

3.3. Procedura badawcza

Procedura oznaczania jonów potasu została opracowana na podstawie badań Mihailovica i in.[30] oraz Yang i in. [19]Poniżej przedstawiono procedurę analityczną zoptymalizowaną i zaadoptowaną do naszych warunków aparaturowych. Próbki z odwirowanym VH (supernatantem) pozostawiono w temperaturze pokojowej na około 1 godzinę po wyjęciu z zamrażarki w temperaturze -20 °C. Każdą próbkę wirowano przez 15 sekund. Następnie 50 µl supernatantu pobrano dwukrotnie i przeniesiono do dwóch 5 ml fiolek Eppendorfa i uzupełniono (całkowicie) wodą dejonizowaną. W rezultacie uzyskano 80-krotne rozcieńczenie. Każdą próbkę mieszano za pomocą vortex'u przez 15 sekund. W zależności od metody, pozostałe etapy procedury różniły się od siebie i zostały opisane w tabeli 3.3.

Tab. 3.3. Procedura oznaczania stężenia jonów potasu w VH metodami ISE i MIP-OES

Etap	ISE	MIP-OES
1	Pobrać ciało szkliste oka (1–2 ml) za pomocą metalowej, spiczastej igły iniekcyjnej (35 × 2 mm).	
2	Wirować VH przy 3500 obr./min przez 10 min.	
3	Odpipetować dwukrotnie 50 µl supernatantu do dwóch 5 ml probówek Eppendorfa.	
4	Napełnić probówki Eppendorf do 4 ml (tj. 3950 µl) wodą dejonizowaną	
5	Mieszać na wyrząsarce typu Vortex przez 15 sekund.	
6	Pour the contents into an intermediate vial (5 ml).	
7	Dodać 80 µl roztworu regulatora siły jonowej (ISA) (roztwór NaCl) i wymieszać	Ilościowo przenieść całą zawartość zlewki do rurki mineralizacyjnej
8	Przepłukać membranę elektrody jonoselektywnej wodą dejonizowaną i wysuszyć.	Probówkę przepłukać kwasem azotowym (3–4 ml) i włączyć do mineralizatora.
9	Umieścić elektrodę w zlewce i odczekać 1 min, aż pomiar się ustabilizuje.	Przeprowadzić mineralizację wspomaganą mikrofalami przez 40 min w temperaturze 180°C.
10	Odczytać i zapisać wynik	Po mineralizacji i osiągnięciu przez roztwór temperatury pokojowej zawartość probówek mineralizacyjnych przelać ilościowo do kolb miarowych o pojemności 10

		mL, a następnie przemyć probówkę wodą dejonizowaną.
11	Po pomiarach umieścić ISE w roztworze o stężeniu 100 mg/l K ⁺ .	Wlać zawartość zlewki do plastikowej probówki o pojemności 15 ml i wykonać pomiary MIP-OES.
12	Po analizie przechowywać próbki VH w temperaturze -20 °C.	

4. Wyniki

4.1. Wybrane parametry walidacyjne metody

Przed przystąpieniem do wykonywania analiz próbek ciała szklistego oka zabezpieczonych w trakcie sekcji zwłok przeprowadzono walidację istotnych - z punktu widzenia celu badań - parametrów walidacyjnych w postaci: precyzji (odchylenie standardowe serii pomiarów), granicy wykrywalności (*Limit of Detection*, LOD), granicy oznaczalności (*Limit of Detection*, LOQ), liniowości, zakresu pomiarowego. W sposób szczególny odniesiono się do oszacowania niepewności pomiarowej metod ISE i MIP-OES, której poświęcono dużą część badań.

Oszacowanie dokładności i selektywnego oznaczania jonów w potasu w ciele szklistym oka jest trudne do wyznaczenia z uwagi na brak materiałów referencyjnych z tego rodzaju matrycą. W przypadku metody ISE oznaczanie stężenia jonów potasu w matrycy płynu z gałki ocznej może być zaburzone przez wpływ jonów interferujących, który został opisany w tabeli 3.2. W przypadku metody MIP-OES w tabeli 5.2. wskazano na możliwość występowania interferencji widmowych od innych pierwiastków takich jak lantan (La, 766,434 nm) i iterb (Yb, 769,949 nm).

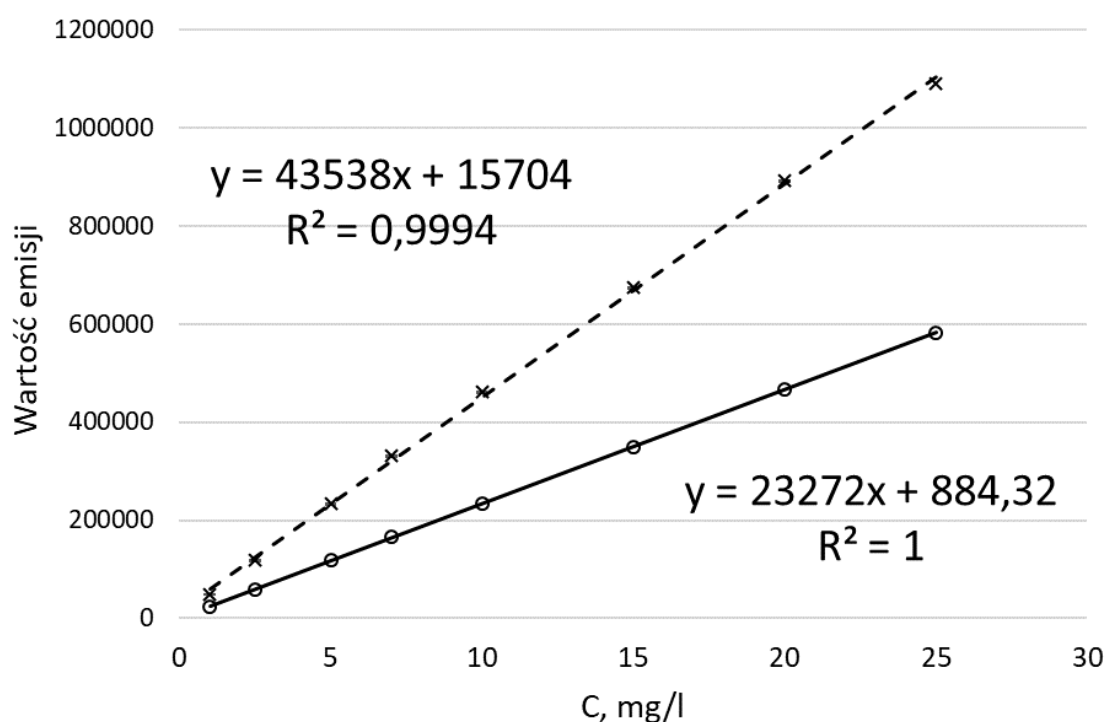
Wyznaczona granica wykrywalności LOD i oznaczalności LOQ została przedstawiona w tabeli 4.1., przy czym relacja między tymi parametrami była następująca $LOQ = 3,3 \cdot LOD$. Dodatkowo wartości w/w parametrów podane w jednostkach stężeń mg/l przeliczono w dalszej części na mmol/l mnożąc razy 80 (krotność rozcieńczenia ciała szklistego oka) i dzieląc je przez wartość 39 (masa atomowa potasu).

Tab. 4.1. Wartości granicy wykrywalności LOD, oznaczalności LOQ i zakresu roboczego metod ISE (n=6) i MIP-OES (n=8) dla oznaczenia jonów potasu w wodzie dejonizowanej w jednostkach mg/l i mmol/l

Parametr	ISE		MIP-OES	
	mg/l	mmol/l*	mg/l	mmol/l*
LOD	0,23	0,47	0,040	0,82
LOQ	0,76	1,6	0,132	2,7
Zakres roboczy	1-100	2-205	1-40	2-82

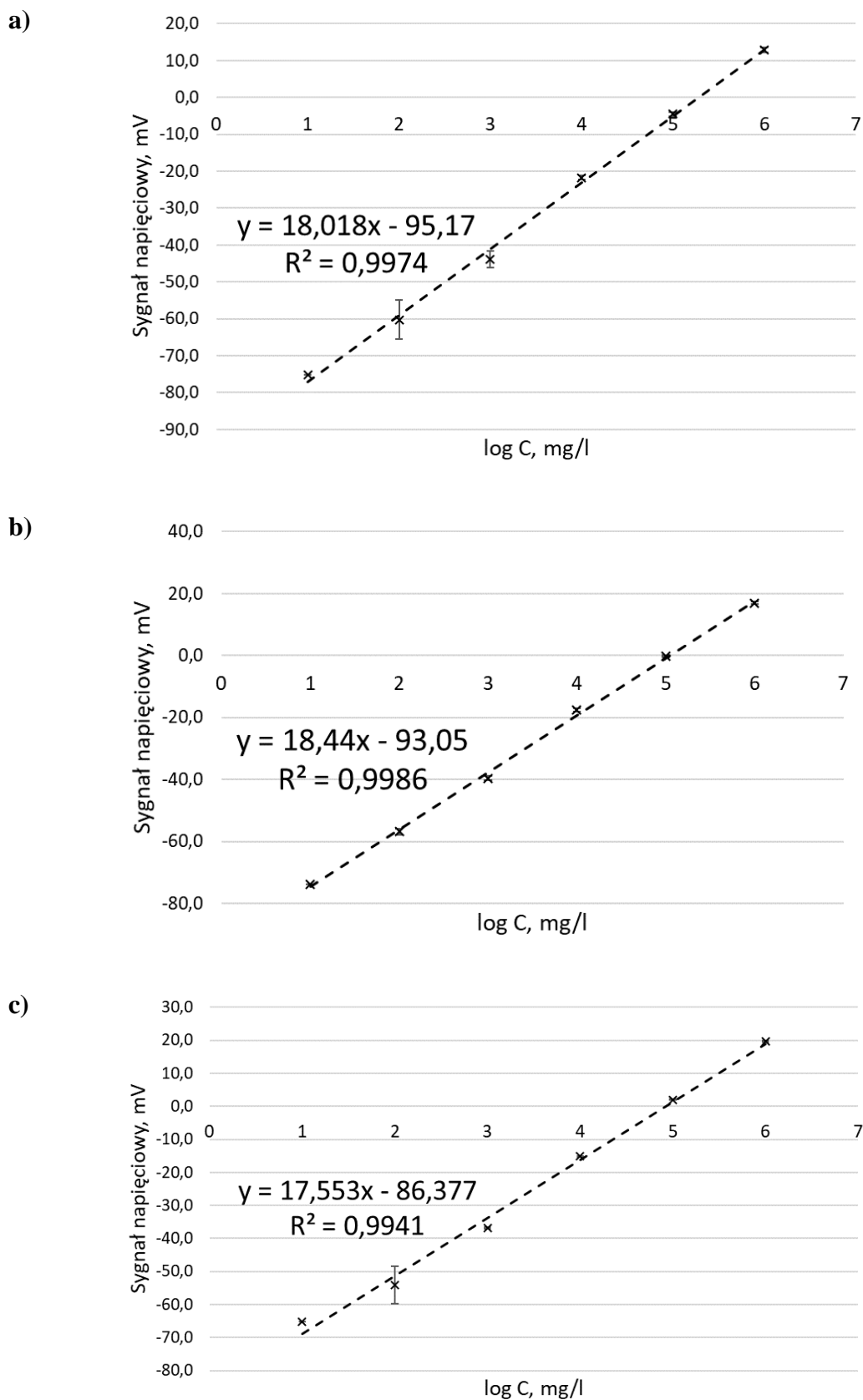
* - wartości w mmol/l odnoszą się do próbek rzeczywistych a relacja do stężenia wyrażona w mg/l jest następująca: $\text{mmol/l} = \text{mg/l} \cdot 80/39$

Krzywe kalibracji uzyskane dla stężeń jonów potasu w zakresie od 1 do 25 mg/l metodą MIP-OES dla dwóch różnych długości fal przedstawiono na rycinie 4.1.



Ryc. 4.1. Krzywe kalibracyjne dla oznaczania stężenia jonów potasu metodą MIP-OES dla dwóch długości fali 766,49 nm (linia przerywana) i 769,89 nm (linia ciągła)

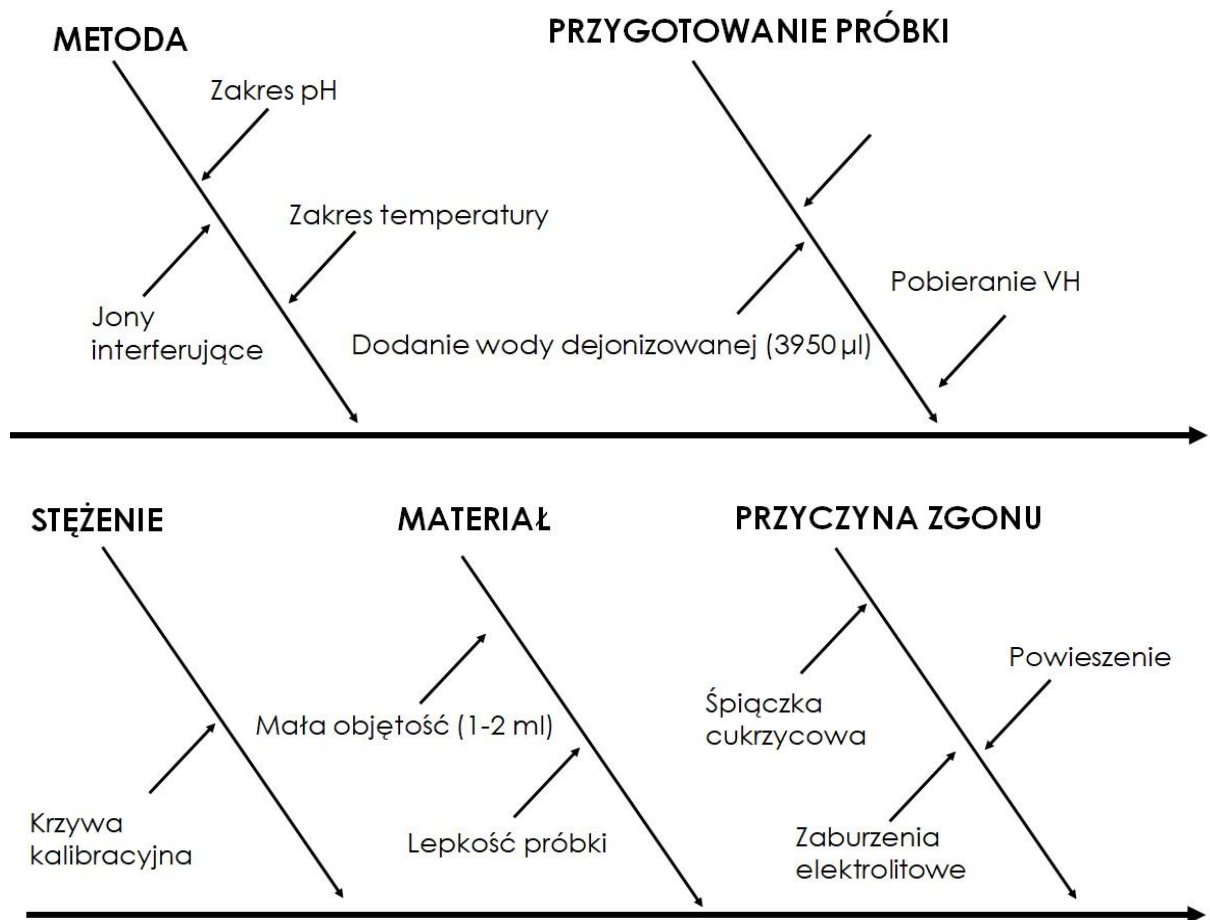
Krzywe kalibracyjne otrzymane dla stężeń jonów potasu w zakresie od 2 do 100 mg/l metodą ISE w trzech seriach pomiarowych (wykonywanych w trzech różnych dniach) wykonanych w sześciu powtórzeniach dla każdego stężenia przedstawiono na rycinie 4.2.



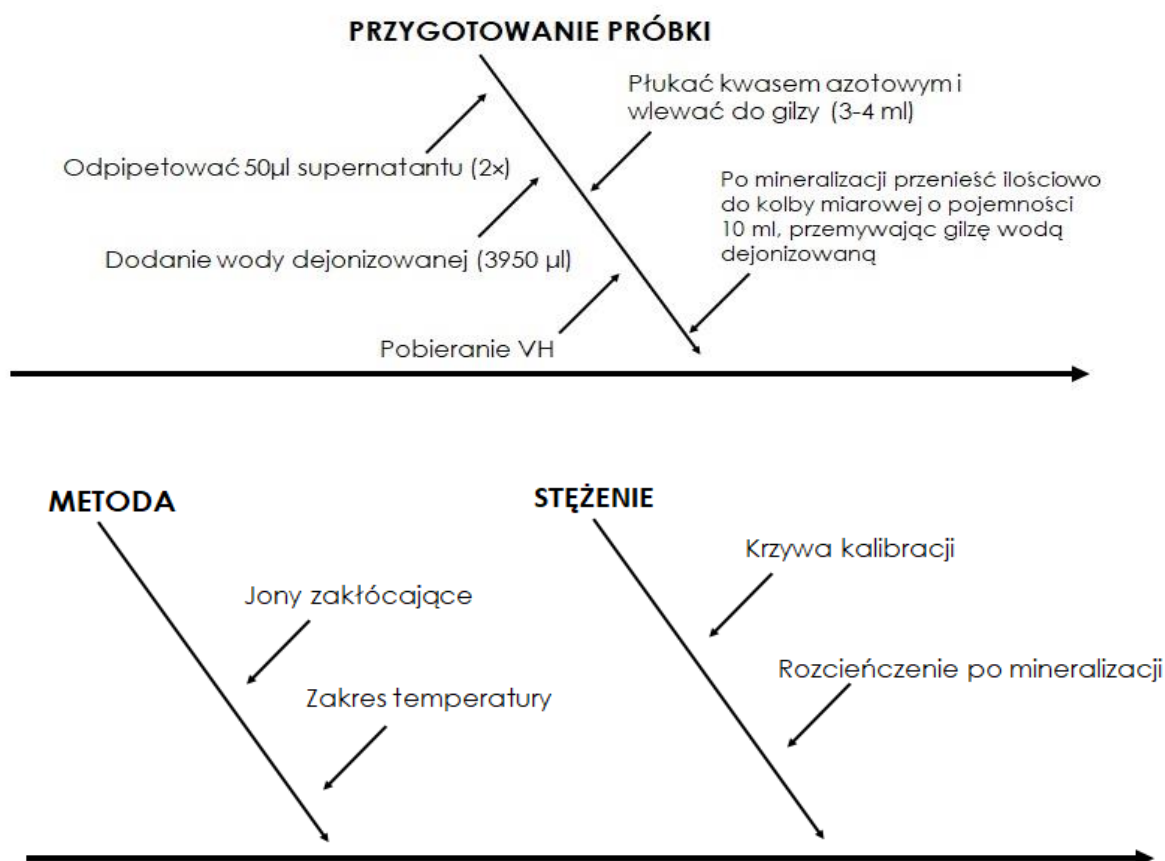
Ryc. 4.2. Krzywe kalibracyjne dla oznaczania stężenia jonów potasu metodą ISE w trzech różnych seriach pomiarowych: 10 marca 2022 (a), 11 marca 2022 (b) i 14 marca 2022 (c)

Niepewność pomiaru typu A i typu B

Na niepewność pomiaru, a co za tym idzie wiarygodność oszacowania PMI, wpływa kilka czynników, w tym właściwości materiału biologicznego, zastosowana metoda pomiaru, proces przygotowania próbki, stężenie próbki oraz przyczyna zgonu, co zostało zilustrowane na rycinie 4.3 i 4.4.



Ryc. 4.3. Składowe niepewności pomiarowej mające wpływ na oznaczane stężenie jonów potasu w VH metodą ISE



Ryc. 4.4. Składowe niepewności pomiarowej mające wpływ na oznaczane stężenia jonów potasu w VH metodą MIP-OES

W celu oszacowania niepewności typu A zbadano próbki wody o niskim (2 mg/l), średnim (10 mg/l) i wysokim (25 mg/l) stężeniu jonów potasu metodami ISE i MIP-OES oraz wyniki wraz z oszacowaną niepewnością przedstawiono w tabeli 4.2.

Tab. 4.2. Oszacowanie niepewności typu A dla oznaczania stężeń jonów potasu 2 mg/l (niskie), 10 mg/l (średnie) i 25 mg/l (wysokie) metodami ISE i MIP-OES

Stężenie K ⁺	Odchylenie standardowe (SD) ISE (mg/l)	Odchylenie standardowe (SD) of MIP-OES (mg/l)	Niepewność rozszerzona (U _A) ¹ ISE (%)	Niepewność rozszerzona (U _A) MIP-OES (%)
Niskie (2 mg/l)	±0.12	±0.012	±12.2	±1.2
Średnie (10 mg/l)	±0.30	±0.111	±6.1	±2.2
Wysokie (25 mg/l)	±0.39	±0.308	±3.1	±2.5

¹ Niepewność rozszerzoną definiuje się jako $U_A = \frac{2 \cdot SD}{\text{stężenie}} \cdot 100\%$.

Składowe budżetu niepewności metod ISE i MIP-OES do szacowania niepewności typu B przedstawiono odpowiednio w tabeli 4.3. i tabeli 4.4.

Tab. 4.3. Składowe budżetu niepewności metody ISE [77]

Etap procedury i uwagi	Objętość (V)	Precyzja (P)	Dokładność (A)
Odpipetować 50 µl dwa razy do probówek Eppendorfa; pipeta o zmiennej pojemności 10–100 µl, precyzja i dokładność do 50 µl	0.05 ml	±0.7%	<0.3%
Napełnić probówkę Eppendorfa do 4 ml (tj. 3950 µl) wodą dejonizowaną; pipeta o zmiennej pojemności 500–5000 µl, precyzja i dokładność do 2500 µl	3.95 ml	±0.6%	<0.15%
Dodać 80 µl roztworu ISA (roztwór NaCl) i wymieszać; pipeta o zmiennej pojemności 10–100 µl, precyzja i dokładność do 50 µl	0.08 ml	±0.8%	<0.2%
Wpływ wahań temperatury na pomiar ISE	brak danych	brak danych	<2%

Tab. 4.4. Składowe budżetu niepewności metody MIP-OES [78], [79]

Etap procedury i uwagi	Objętość (V)	Precyzja (P)	Dokładność (A)
Dodać 50 µl dwa razy do probówek Eppendorfa; pipeta o zmiennej pojemności 10–100 µl, precyzja i dokładność do 50 µl	0.05 ml	±0.7%	<0.3%
Napełnić probówkę Eppendorfa do 4 ml (tj. 3950 µl) wodą dejonizowaną; pipeta o zmiennej pojemności 500–5000 µl, precyzja i dokładność do 2500 µl	3.95 ml	±0.6%	<0.15%
Po mineralizacji i osiągnięciu temperatury pokojowej zawartość gilz przelać ilościowo do kolb miarowych o pojemności 10 ml, a następnie przemyć gilzy wodą dejonizowaną.	10 ml	±0.08 ml	brak danych

Wykorzystując składowe budżetu niepewności zestawione w tabeli 4.3. i tabeli 4.4. oszacowano niepewność rozszerzoną metodami ISE i MIP-OES (tab. 4.5.).

Tab. 4.5. Wyniki oszacowania niepewności rozszerzonej typu B dla oznaczania stężenia jonów potasu metodami ISE i MIP-OES

Stężenie K ⁺	U _B dla ISE (mg/l)	U _B dla MIP-OES (mg/l)	Niepewność rozszerzona (U _B) ¹ ISE (%)	Niepewność rozszerzona (U _B) MIP-OES (%)
Niskie (2 mg/l)	±0.24	±0.051	±4.75	±2.53
Średnie (10 mg/l)	±0.48	±0.253	±4.75	±2.53
Wysokie (25 mg/l)	±1.19	±0.633	±4.75	±2.53

¹ Niepewność typu B (U_B) zdefiniowana jako $U_B = k \cdot C \cdot \sqrt{\sum P^2 + \sum A^2}$, gdzie $k = 2$, C jest nominalnym stężeniem jonów potasu, P - precyzja, A dokładność

W tabeli 4.6. przedstawiono wybranych 26 przypadków, dla których oznaczono stężenie jonów potasu dwiema metodami, opartymi o różne zasady fizykochemiczne - ISE i MIP-OES, natomiast w kolumnie PMI podano wartości czasu zgonu wynikającego z okoliczności zdarzenia.

Tab. 4.6. Wyniki oceny PMI (na podstawie danych z tabeli 3.1.) oraz oznaczenia stężenia jonów potasu w VH metodami ISE i MIP-OES u 26 zmarłych osób

Lp.	Stężenie of K ⁺ dla ISE (mmol/l)	Stężenie K ⁺ dla MIP-OES (mmol/l)	PMI (h)
1	17.0	15.1	40
2	22.4	44.2	36
3	19.2	31.4	98
4	19.9	19.7	23
5	18.6	21.9	82
6	18.7	24.4	88
7	10.5	16.9	71
8	30.8	27.7	91
9	21.3	35.6	44
10	7.59	27.0	46
11	10.4	16.8	72

Lp.	Stężenie of K ⁺ dla ISE (mmol/l)	Stężenie K ⁺ dla MIP-OES (mmol/l)	PMI (h)
12	24.2	21.0	107
13	23.8	22.0	99
14	16.6	23.0	84
15	23.5	29.4	70
16	12.2	12.7	57
17	11.0	21.9	68
18	7.91	7.42	40
19	37.1	39.0	104
20	15.8	23.3	67
21	16.6	25.5	42
22	16.0	24.8	93
23	23.3	21.7	69
24	28.2	25.7	70
25	18.7	18.3	117
26	25.6	29.4	81

4.2. Analiza przypadków sekcyjnych

W trakcie 94. sekcji zwłok zabezpieczono próbki ciała szklistego oka, przeprowadzono ich analizę metodą ISE, a następnie skojarzono ich wyniki z informacjami dotyczącymi okoliczności zgonów (m.in. płeć, wiek, przyczyna zgonu). W tabeli 4.7. zestawiono wszystkie 94 analizowane próbki metodą ISE zwykle w dwóch seriach pomiarowych po 3 pomiary w każdej serii. Wyniki odbiegające zostały odrzucone testem Dixona. Ustalony, na podstawie okoliczności, czas jaki upłynął od zgonu (PMI_{okol}) mieścił się w zakresie od 29 do 497 h. Najwyższe odnotowane stężenie jonów potasu w cieple szklistym oka ([K⁺]) wynosiło 25,23 mmol/l (dla PMI =146 h), natomiast najniższe 5,07 mmol/l (dla PMI_{okol} = 59 h).

Tab. 4.7. Wyniki oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka dla 94 przypadków sekcyjnych; C₁, C₂, C₃ – wyniki pomiarów stężenia jonów potasu w jednej serii metodą ISE, C_{śr} - stężenie średnie, SD – odchylenie standardowe dla trzech pomiarów, RSD – względne odchylenie standardowe (znakiem * w nawiasie zaznaczono wynik odbiegający odrzucony za pomocą testu Dixona)

SL	Przyczyna zgonu	PMI, h	Data	C ₁ , mmol/l	C ₂ , mmol/l	C ₃ , mmol/l	C _{śr} , mmol/l	SD, mmol/l	RSD, %
I seria pomiarowa									
315/20	CH	40	15-lut-23	12,74	13,54	14,38	13,55	0,82	6,06
375/20	CH	161	20-lut-23	(14,93)*	23,59	24,62	21,05	5,32	25,27
389/20	U	234	03-lut-23	12,37	12,47	12,57	12,47	0,10	0,82
392/20	P	36	03-lut-23	17,46	16,82	17,01	17,09	0,33	1,91
396/20	U	70	03-lut-23	9,35	9,03	9,03	9,14	0,19	2,07
399/20	U	59	28-lut-23	4,82	5,17	5,21	5,07	0,21	4,23
405/20	U	115	20-lut-23	9,31	9,54	9,99	9,61	0,34	3,59
409/20	CH	98	03-lut-23	11,67	11,71	11,22	11,54	0,27	2,37
412/20	P	35	03-lut-23	6,97	8,21	8,41	7,86	0,78	9,88
418/20	P	161	20-lut-23	16,02	16,43	17,15	16,53	0,57	3,45
429/20	CH	95	03-lut-23	18,99	18,79	18,24	18,67	0,39	2,10
431/20	CH	320	28-lut-23	7,10	7,32	7,41	7,28	0,16	2,19
438/20	CH	87	03-lut-23	11,47	10,99	10,81	11,09	0,34	3,05
454/20	P	49	03-lut-23	6,05	6,48	6,58	6,37	0,28	4,44
474/20	CH	119	27-lut-23	8,04	9,50	9,83	9,12	0,95	10,41
477/20	CH	123	20-lut-23	11,08	11,51	11,98	11,52	0,45	3,92
499/20	CH	113	27-lut-23	13,93	14,34	15,43	14,56	0,77	5,31
501/20	CH	91	03-lut-23	17,91	18,38	18,75	18,35	0,42	2,30
510/20	N	72	03-lut-23	13,05	12,80	12,70	12,85	0,18	1,39
513/20	CH	43	03-lut-23	9,31	9,11	9,33	9,25	0,12	1,35
514/20	CH	46	03-lut-23	9,52	9,23	9,17	9,31	0,19	2,00
515/20	CH	56	03-lut-23	6,83	7,51	7,65	7,33	0,44	5,98
520/20	CH	107	03-lut-23	28,51	27,08	26,87	27,49	0,89	3,25
530/20	U	96	03-lut-23	12,43	12,76	12,66	12,62	0,17	1,33
533/20	CH	100	03-lut-23	13,50	13,11	13,09	13,23	0,23	1,75
538/20	P	84	15-lut-23	16,33	16,92	16,80	16,68	0,31	1,88
566/20	CH	69	14-lut-23	17,97	18,03	18,19	18,06	0,12	0,65
567/20	U	64	15-lut-23	7,57	7,79	7,67	7,68	0,11	1,47
569/20	CH	65	15-lut-23	8,35	8,18	8,35	8,29	0,09	1,14
593/20	CH	158	28-lut-23	21,54	22,36	22,15	22,02	0,43	1,94
600/20	P	43	14-lut-23	16,68	16,84	16,94	16,82	0,13	0,80
615/20	CH	40	15-lut-23	11,94	12,18	11,96	12,03	0,14	1,14
733/20	CH	104	15-lut-23	14,93	14,93	15,06	14,97	0,07	0,47
219/21	N	43	27-lut-23	6,97	7,04	7,26	7,09	0,15	2,13
225/21	U	42	16-lut-23	11,12	11,55	11,20	11,29	0,23	2,03
227/21	U	83	17-lut-23	19,28	20,49	20,72	20,16	0,77	3,83
308/21	P	130	16-lut-23	5,27	5,35	5,48	5,37	0,10	1,92
317/21	P	42	16-lut-23	9,42	9,56	10,05	9,68	0,33	3,45
545/21	CH	195	17-lut-23	17,97	18,15	18,11	18,08	0,10	0,54
563/21	CH	92	16-lut-23	12,14	12,35	12,37	12,29	0,12	1,02
602/21	U	200	16-lut-23	13,48	13,78	13,15	13,47	0,32	2,36

SL	Przyczyna zgonu	PMI, h	Data	C ₁ , mmol/l	C ₂ , mmol/l	C ₃ , mmol/l	C _{śr} , mmol/l	SD, mmol/l	RSD, %
604/21	U	497	16-lut-23	14,79	14,63	14,09	14,50	0,36	2,51
608/21	Z	131	17-lut-23	15,30	15,24	15,38	15,31	0,07	0,47
616/21	CH	68	17-lut-23	9,09	9,07	9,33	9,16	0,15	1,62
617/21	CH	70	17-lut-23	15,26	15,94	15,79	15,66	0,36	2,28
626/21	CH	117	16-lut-23	13,46	13,66	13,17	13,43	0,25	1,84
630/21	P	68	17-lut-23	11,96	12,25	12,23	12,14	0,16	1,32
631/21	P	67	20-lut-23	12,37	12,90	13,25	12,84	0,44	3,46
660/21	U	48	16-lut-23	5,52	5,70	5,78	5,67	0,14	2,41
80/22	U	191	20-lut-23	18,52	18,95	19,51	18,99	0,49	2,60
94/22	CH	105	20-lut-23	10,36	10,52	10,93	10,61	0,30	2,79
99/22	U	52	17-lut-23	5,91	6,07	6,05	6,01	0,09	1,49
100/22	U	60	27-lut-23	8,68	9,46	9,46	9,20	0,45	4,89
101/22	CH	46	28-lut-23	10,11	10,28	10,34	10,24	0,12	1,14
105/22	U	68	22-lut-23	15,10	14,69	15,63	15,14	0,47	3,13
134/22	CH	113	21-lut-23	11,43	13,23	14,81	13,16	1,69	12,87
136/22	CH	81	21-lut-23	12,84	13,56	13,95	13,45	0,56	4,18
180/22	Z	80	20-lut-23	7,53	8,12	8,33	7,99	0,42	5,20
185/22	CH	70	22-lut-23	14,56	16,92	17,42	16,30	1,52	9,35
187/22	N	69	20-lut-23	17,99	19,36	20,21	19,19	1,12	5,83
210/22	U	34	27-lut-23	6,09	6,67	6,85	6,54	0,40	6,06
220/22	P	36	21-lut-23	14,03	14,87	14,69	14,53	0,44	3,04
290/22	U	128	27-lut-23	23,18	23,59	24,41	23,73	0,63	2,64
293/22	U	58	22-lut-23	7,94	8,41	8,76	8,37	0,41	4,92
295/22	U	25	28-lut-23	7,32	7,63	7,86	7,60	0,27	3,52
352/22	U	104	28-lut-23	14,34	14,46	14,73	14,51	0,20	1,37
365/22	U	49	28-lut-23	12,96	12,90	13,17	13,01	0,14	1,07
372/22	N	65	20-lut-23	10,46	10,97	11,16	10,86	0,36	3,33
374/22	P	64	16-lut-23	12,12	12,37	12,39	12,29	0,15	1,21
425/22	N	56	28-lut-23	9,50	9,60	9,46	9,52	0,07	0,78
436/22	CH	38	22-lut-23	8,23	8,62	8,70	8,51	0,25	2,96
438/22	U	58	22-lut-23	16,55	16,70	16,31	16,52	0,20	1,19
459/22	U	128	22-lut-23	11,16	10,99	11,16	11,10	0,09	0,85
494/22	Z	50	22-lut-23	8,33	8,21	8,45	8,33	0,12	1,48
555/22	U	41	22-lut-23	8,16	8,14	8,43	8,25	0,16	1,94
575/22	CH	69	28-lut-23	11,18	11,08	11,26	11,17	0,09	0,83
587/22	U	70	27-lut-23	18,95	19,43	20,02	19,47	0,53	2,75
604/22	U	72	22-lut-23	11,16	11,34	11,14	11,21	0,11	1,01
606/22	P	61	20-lut-23	9,93	10,40	10,61	10,31	0,35	3,37
614/22	Z	38	22-lut-23	16,08	19,16	20,41	18,55	2,23	12,01
643/22	U	29	20-lut-23	9,70	10,36	10,58	10,22	0,46	4,49
646/22	CH	55	20-lut-23	4,92	5,21	5,29	5,14	0,19	3,77
655/22	Z	130	20-lut-23	15,82	16,02	16,84	16,23	0,54	3,34
676/22	N	50	17-mar-23	14,52	14,17	14,65	14,45	0,24	1,69
009/23	P	49	22-lut-23	8,41	8,86	9,05	8,77	0,33	3,73
16/23	P	109	21-lut-23	19,16	20,72	21,95	20,61	1,40	6,78
86/23	P	82	20-lut-23	10,63	11,02	11,53	11,06	0,45	4,09
91/23	Z	64	22-lut-23	10,48	10,26	10,40	10,38	0,11	1,10
102/23	CH	146	17-mar-23	24,62	25,03	26,05	25,23	0,74	2,93
114/23	CH	47	23-lut-23	6,52	6,46	6,50	6,50	0,03	0,48
121/23	P	202	17-mar-23	18,89	19,88	19,88	19,55	0,57	2,91
133/23	P	82	17-mar-23	10,44	11,04	10,99	10,82	0,33	3,07

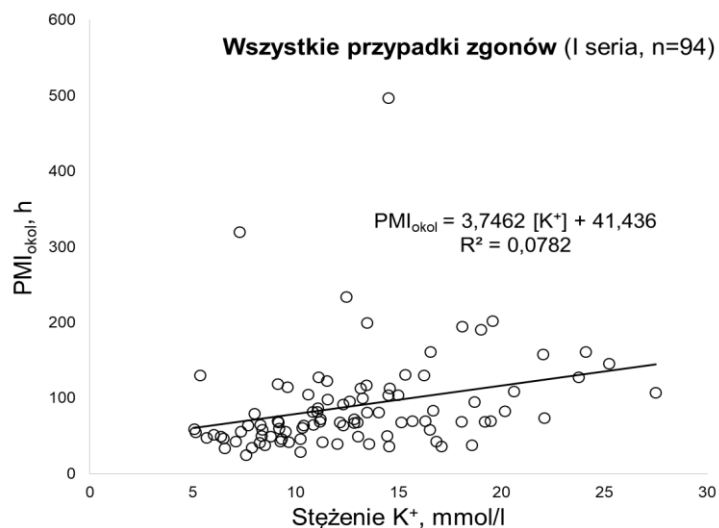
SL	Przyczyna zgonu	PMI, h	Data	C ₁ , mmol/l	C ₂ , mmol/l	C ₃ , mmol/l	C _{śr} , mmol/l	SD, mmol/l	RSD, %
153/23	Z	81	22-mar-23	14,26	13,89	13,97	14,04	0,19	1,38
118/23	CH	74	23-mar-23	21,95	21,95	22,36	22,09	0,24	1,07
131/23	U	68	23-mar-23	12,62	13,03	13,31	12,98	0,35	2,70
II seria pomiarowa									
315/20	CH	40	08-mar-23	14,15	13,19	13,85	13,73	0,49	3,59
375/20	CH	161	01-mar-23	12,96	11,94	12,39	12,43	0,51	4,14
389/20	U	234	01-mar-23	15,32	15,16	15,88	15,45	0,38	2,43
392/20	P	36	01-mar-23	8,57	9,01	9,37	8,98	0,40	4,46
396/20	U	70	06-mar-23	5,27	5,58	5,46	5,44	0,15	2,85
399/20	U	59	01-mar-23	9,33	10,36	10,75	10,15	0,73	7,21
405/20	U	115	01-mar-23	9,64	11,36	11,94	10,98	1,20	10,89
409/20	CH	98	01-mar-23	15,82	16,84	17,21	16,62	0,72	4,35
412/20	P	35	06-mar-23	7,71	7,84	7,69	7,75	0,08	1,00
418/20	P	161	01-mar-23	9,46	10,03	10,56	10,02	0,55	5,53
429/20	CH	95	01-mar-23	6,09	6,36	6,75	6,40	0,33	5,16
431/20	CH	320	01-mar-23	8,04	8,18	8,82	8,35	0,41	4,97
438/20	CH	87	01-mar-23	12,98	13,11	13,85	13,31	0,47	3,50
454/20	P	49	03-mar-23	18,69	18,42	19,22	18,78	0,41	2,17
474/20	CH	119	próbki nie analizowano						
477/20	CH	123	03-mar-23	9,81	10,07	10,38	10,09	0,29	2,85
499/20	CH	113	03-mar-23	12,70	13,42	14,01	13,37	0,66	4,92
501/20	CH	91	02-mar-23	103,04	100,72	101,95	101,90	1,16	1,14
510/20	N	72	02-mar-23	24,41	24,62	26,05	25,03	0,89	3,57
513/20	CH	43	02-mar-23	10,91	11,49	12,31	11,57	0,70	6,06
514/20	CH	46	02-mar-23	11,34	11,82	12,59	11,92	0,63	5,30
515/20	CH	56	02-mar-23	14,24	14,89	15,71	14,95	0,74	4,95
520/20	CH	107	03-mar-23	14,63	15,32	15,75	15,23	0,57	3,74
530/20	U	96	03-mar-23	6,81	7,24	7,32	7,12	0,28	3,87
533/20	CH	100	08-mar-23	6,85	7,90	8,39	7,71	0,79	10,19
538/20	P	84	06-mar-23	22,56	22,15	22,56	22,43	0,24	1,06
566/20	CH	69	08-mar-23	13,56	13,99	14,50	14,02	0,47	3,37
567/20	U	64	03-mar-23	16,08	17,21	17,29	16,86	0,68	4,01
569/20	CH	65	03-mar-23	13,37	14,26	14,15	13,93	0,48	3,46
593/20	CH	158	03-mar-23	19,16	19,45	19,86	19,49	0,35	1,80
600/20	P	43	próbki nie analizowano						
615/20	CH	40	08-mar-23	6,01	6,58	6,87	6,49	0,44	6,76
733/20	CH	104	03-mar-23	12,08	12,04	12,43	12,18	0,21	1,76
219/21	N	43	03-mar-23	9,52	10,36	10,44	10,11	0,51	5,06
225/21	U	42	03-mar-23	11,08	11,49	11,82	11,46	0,37	3,23
227/21	U	83	03-mar-23	20,51	20,18	21,33	20,68	0,59	2,86
308/21	P	130	03-mar-23	12,90	12,66	13,29	12,95	0,32	2,48
317/21	P	42	03-mar-23	14,67	14,38	14,81	14,62	0,22	1,50
545/21	CH	195	06-mar-23	21,74	23,18	23,18	22,70	0,83	3,65
563/21	CH	92	06-mar-23	11,86	12,72	12,82	12,46	0,53	4,25
602/21	U	200	06-mar-23	19,34	20,33	20,18	19,95	0,53	2,67
604/21	U	497	06-mar-23	15,63	16,10	16,41	16,05	0,39	2,45
608/21	Z	131	06-mar-23	15,14	15,26	15,53	15,31	0,20	1,30
616/21	CH	68	06-mar-23	6,58	6,95	7,08	6,87	0,26	3,73
617/21	CH	70	29-mar-23	11,77	10,99	11,45	11,41	0,39	3,43
626/21	CH	117	08-mar-23	8,90	9,44	9,64	9,33	0,38	4,09

SL	Przyczyna zgonu	PMI, h	Data	C ₁ , mmol/l	C ₂ , mmol/l	C ₃ , mmol/l	C _{śr} , mmol/l	SD, mmol/l	RSD, %
630/21	P	68	08-mar-23	7,28	7,67	7,92	7,62	0,32	4,21
631/21	P	67	08-mar-23	9,17	9,62	9,91	9,57	0,37	3,89
660/21	U	48	08-mar-23	11,28	11,41	12,21	11,63	0,50	4,31
80/22	U	191	08-mar-23	12,35	12,57	13,37	12,77	0,54	4,22
94/22	CH	105	08-mar-23	12,70	13,50	13,64	13,28	0,51	3,83
99/22	U	52	08-mar-23	10,30	10,52	10,71	10,51	0,21	1,96
100/22	U	60	08-mar-23	13,56	13,46	13,93	13,65	0,25	1,82
101/22	CH	46	08-mar-23	20,21	19,98	20,02	20,07	0,12	0,60
105/22	U	68	10-mar-23	12,12	11,92	12,43	12,16	0,26	2,12
134/22	CH	113	29-mar-23	6,56	6,79	7,06	6,80	0,25	3,62
136/22	CH	81	10-mar-23	7,34	7,57	8,94	7,95	0,87	10,89
180/22	Z	80	13-mar-23	14,85	14,26	14,69	14,60	0,31	2,10
185/22	CH	70	13-mar-23	11,67	11,61	12,06	11,78	0,24	2,08
187/22	N	69	13-mar-23	11,34	11,63	12,33	11,77	0,51	4,30
210/22	U	34	13-mar-23	9,46	9,70	10,36	9,84	0,47	4,74
220/22	P	36	13-mar-23	8,51	8,76	9,29	8,85	0,40	4,50
290/22	U	128	13-mar-23	10,42	10,93	11,55	10,97	0,56	5,15
293/22	U	58	13-mar-23	15,59	16,29	16,94	16,27	0,68	4,16
295/22	U	25	13-mar-23	8,55	9,19	9,52	9,09	0,49	5,39
352/22	U	104	13-mar-23	15,71	16,78	17,11	16,53	0,73	4,41
365/22	U	49	13-mar-23	10,30	10,91	11,12	10,78	0,43	3,96
372/22	N	65	13-mar-23	16,14	15,98	16,41	16,18	0,22	1,34
374/22	P	64	13-mar-23	4,62	4,84	5,05	4,83	0,22	4,46
425/22	N	56	13-mar-23	14,58	15,02	15,43	15,01	0,42	2,80
436/22	CH	38	13-mar-23	6,71	6,97	7,32	7,00	0,31	4,41
438/22	U	58	16-mar-23	18,15	16,80	17,19	17,38	0,70	4,01
459/22	U	128	16-mar-23	10,89	10,83	11,30	11,01	0,26	2,33
494/22	Z	50	16-mar-23	7,94	8,16	8,68	8,26	0,38	4,58
555/22	U	41	24-mar-23	8,84	8,74	9,19	8,92	0,24	2,65
575/22	CH	69	27-mar-23	10,71	11,12	10,91	10,91	0,21	1,88
587/22	U	70	27-mar-23	18,01	17,64	17,78	17,81	0,19	1,04
604/22	U	72	27-mar-23	19,77	19,41	19,84	19,67	0,23	1,18
606/22	P	61	próbki nie analizowano						
614/22	Z	38	29-mar-23	15,65	15,61	15,88	15,71	0,14	0,91
643/22	U	29	28-mar-23	13,13	11,84	12,04	12,34	0,69	5,63
646/22	CH	55	27-mar-23	12,98	12,84	12,98	12,94	0,08	0,64
655/22	Z	130	27-mar-23	27,90	26,46	26,67	27,01	0,78	2,88
676/22	N	50	27-mar-23	8,70	8,76	8,78	8,75	0,04	0,49
009/23	P	49	27-mar-23	5,31	5,31	5,44	5,35	0,07	1,33
16/23	P	109	próbki nie analizowano						
86/23	P	82	27-mar-23	14,52	14,05	14,34	14,30	0,24	1,66
91/23	Z	64	27-mar-23	20,18	20,33	20,25	20,25	0,07	0,36
102/23	CH	146	29-mar-23	14,71	14,61	15,04	14,78	0,23	1,52
114/23	CH	47	29-mar-23	20,51	20,92	21,74	21,06	0,63	2,98
121/23	P	202	24-mar-23	6,65	6,87	7,34	6,95	0,36	5,12
133/23	P	82	29-mar-23	16,43	16,74	17,31	16,83	0,45	2,66
153/23	Z	81	29-mar-23	7,49	7,86	8,31	7,88	0,41	5,21
118/23	CH	74	28-mar-23	21,33	21,13	21,33	21,26	0,12	0,56
131/23	U	68	29-mar-23	11,14	10,63	11,16	10,97	0,30	2,75

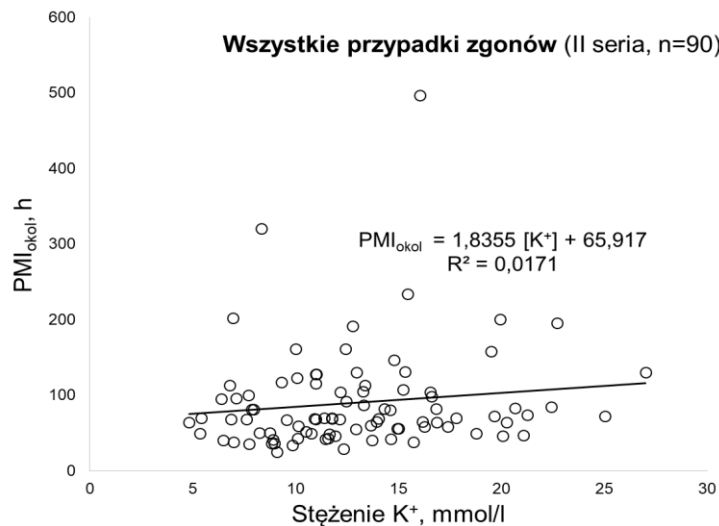
Na podstawie znajomości okoliczności zgonów utworzono kategorie:

- płci - większość stanowili mężczyźni (81%, n=76);
- wieku – cztery kategorie w grupach 15-30 lat (n=22), 31-45 lat (n=24), 46-60 lat (n=24), 61-99 lat (n=23);
- przyczyny zgonów - dla analizowanych przypadków utworzono grupy i opisano skrótami: CH (zgon z przyczyn chorobowych, n=35), U (zgon w wyniku urazu, n=28), P (zgon w wyniku powieszenia, n=18), Z (zgon w wyniku zatrucia, n=7), N (nieustalona przyczyna zgonu, n=6).

W związku z tym iż w II serii pomiarowej oznaczone trzy stężenia jonów potasu odbiegały znacząco od I serii pomiarowej, postanowiono poniżej zestawić stężenia osobno dla I i II serii pomiarowej (odpowiednio ryciny 4.5. i 4.6.).



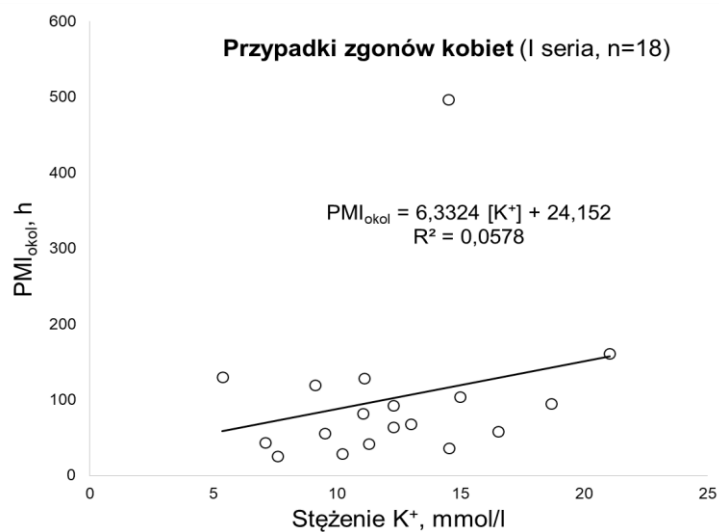
Ryc. 4.5. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla wszystkich przypadków zgonów (n=94, tabela 4.7.)



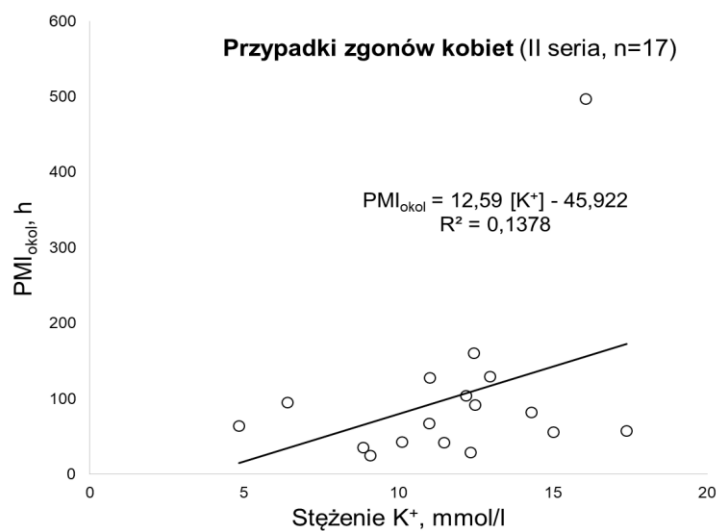
Ryc. 4.6. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla wszystkich przypadków zgonów ($n=90$, tabela 4.7.)

4.2.1 Płeć

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} kobiet przygotowano ryciny 4.7. i 4.8. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

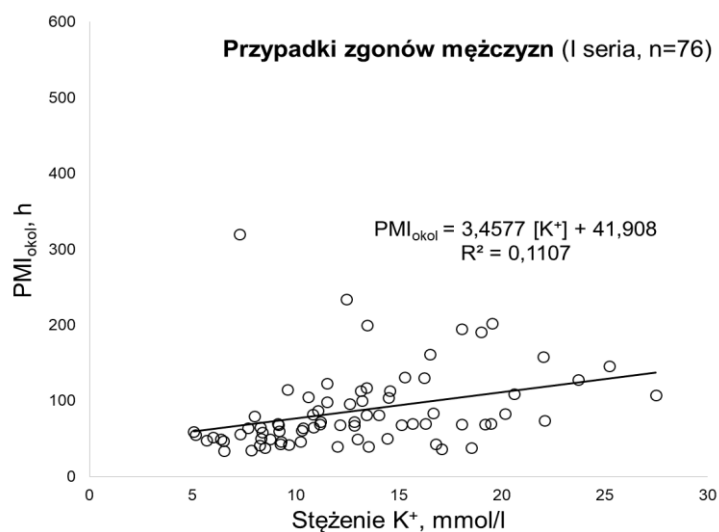


Ryc. 4.7. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów kobiet ($n=18$, tabela 4.7.)

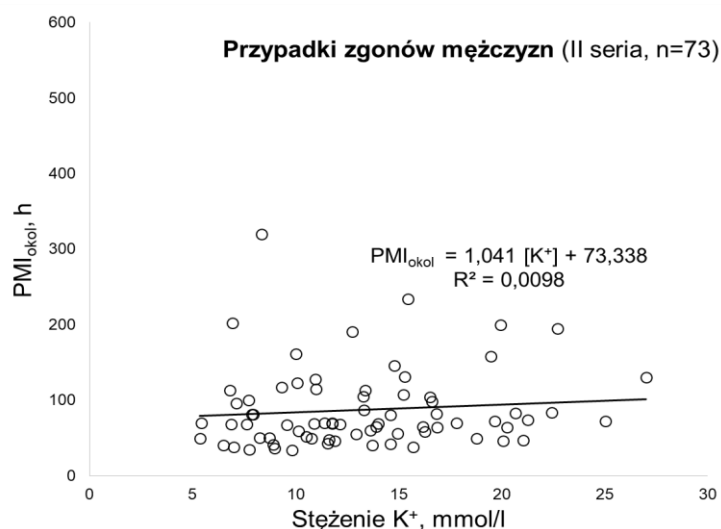


Ryc. 4.8. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów kobiet (n=17, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} mężczyzn przygotowano ryciny 4.9. i 4.10. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.



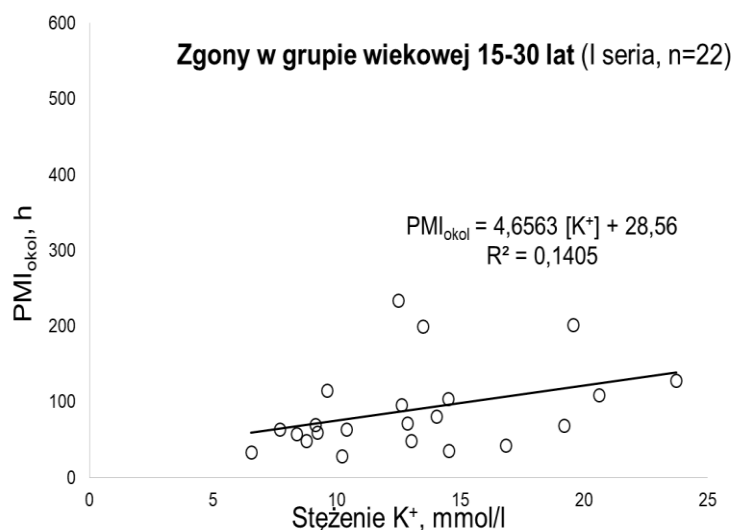
Ryc. 4.9. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów mężczyzn (n=76, tabela 4.7.)



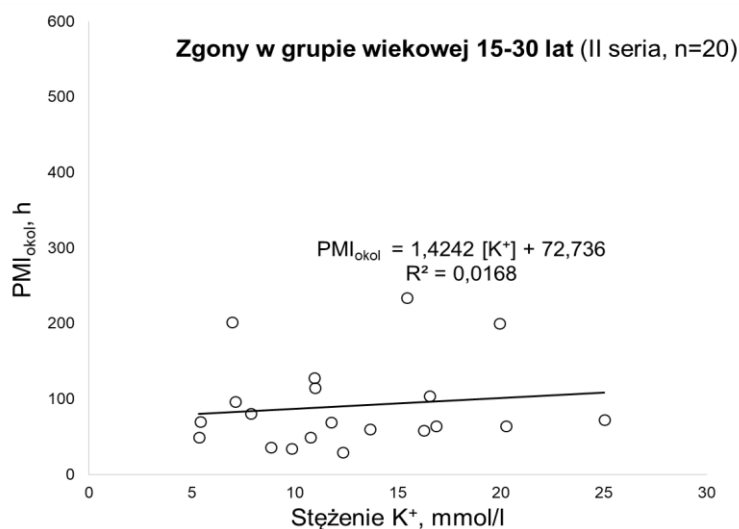
Ryc. 4.10. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów mężczyzn (n=73, tabela 4.7.)

4.2.1. Wiek

Wiek osób, od których został pobrany materiał biologiczny mieścił się w zakresie od 16 do 99 lat (średnio 46 lat). Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} denatów w grupie wiekowej 15-30 lat przygotowano ryciny 4.11. i 4.12. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

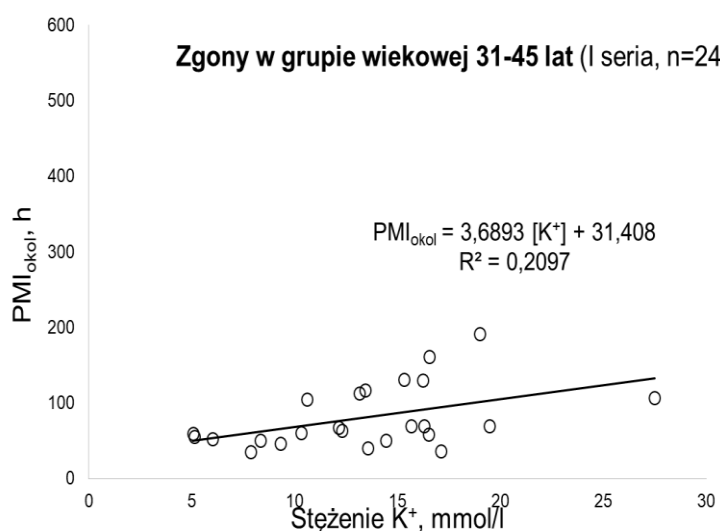


Ryc. 4.11. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 15-30 lat (n=22, tabela 4.7.)

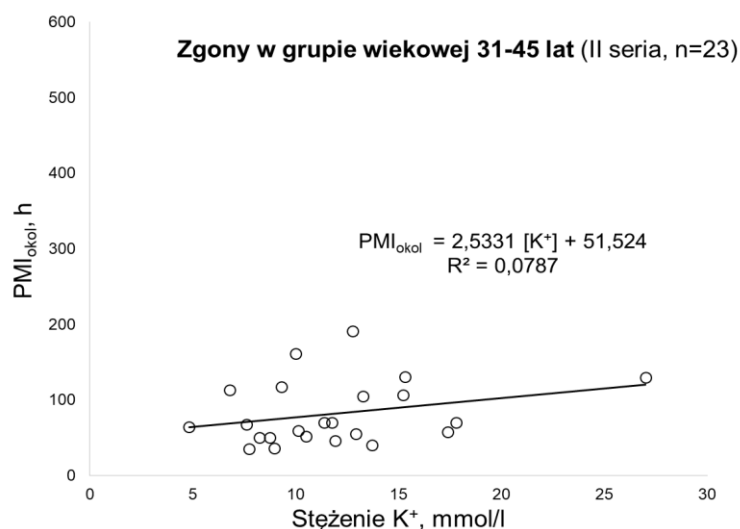


Ryc. 4.12. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 15-30 lat (n=22, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} denatów w grupie wiekowej 31-45 lat przygotowano ryciny 4.13. i 4.14. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

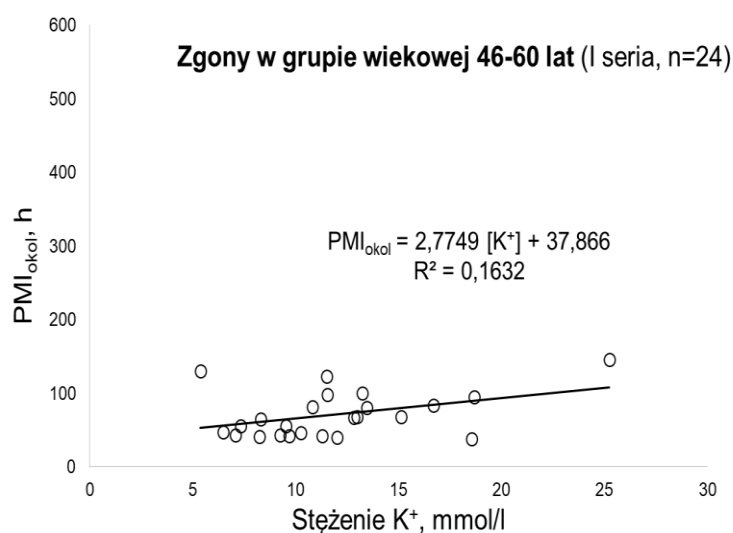


Ryc. 4.13. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 16-45 lat (n=24, tabela 4.7.)

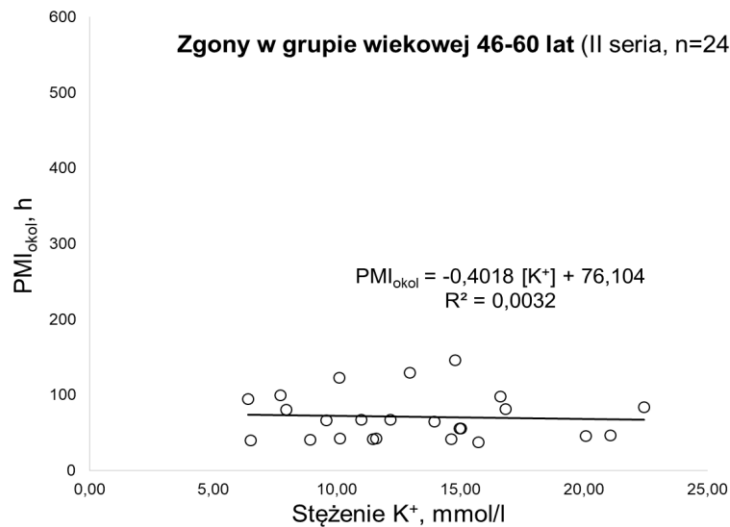


Ryc. 4.14. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 31-45 lat (n=23, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} denatów w grupie wiekowej 46-60 lat przygotowano ryciny 4.15. i 4.16. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

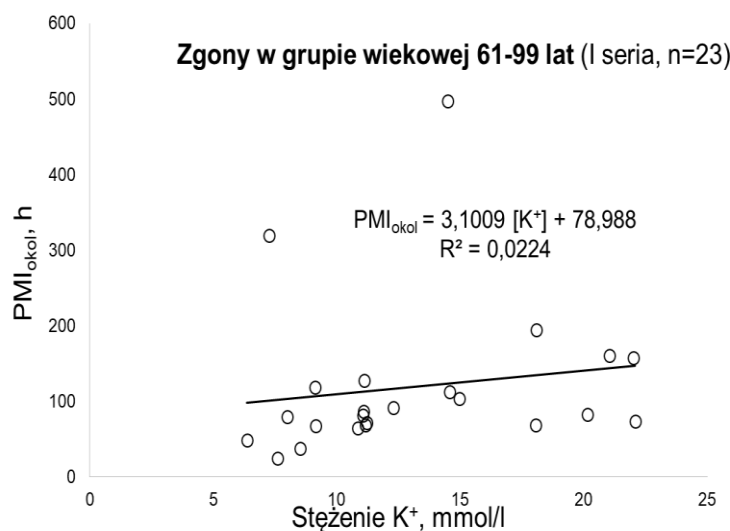


Ryc. 4.15. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 46-60 lat (n=24, tabela 4.7.)

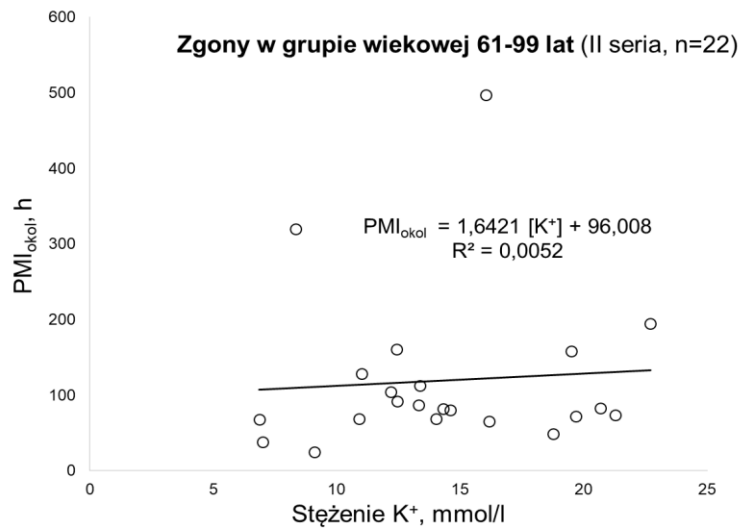


Ryc. 4.16. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ([K⁺]) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 46-60 lat (n=24, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} denatów w grupie wiekowej 60-99 lat przygotowano ryciny 4.17. i 4.18. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.



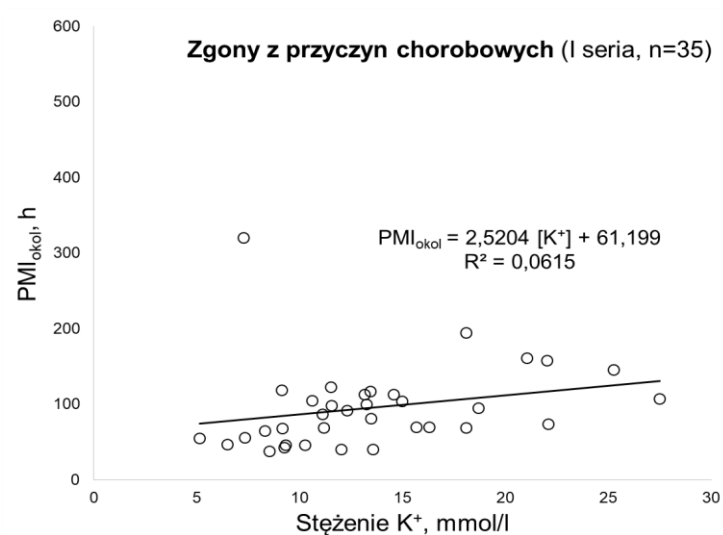
Ryc. 4.17. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ([K⁺]) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 61-99 lat (n=23, tabela 4.7.)



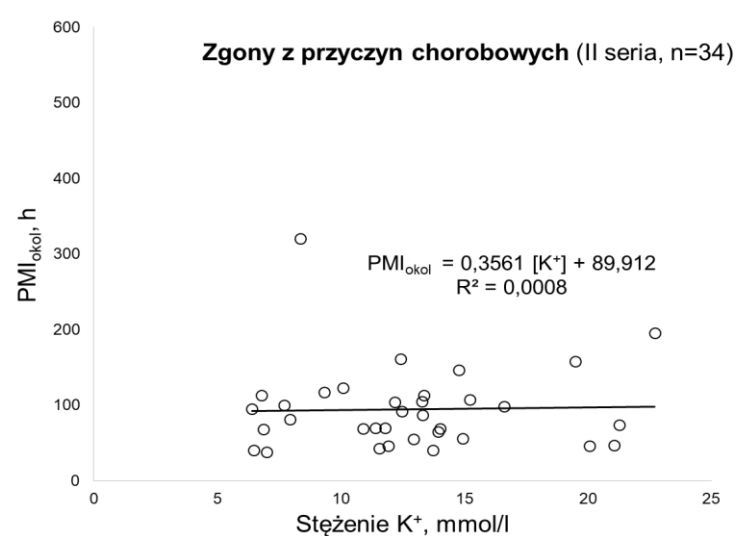
Ryc. 4.18. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie wiekowej 61-99 lat (n=22, tabela 4.7.)

4.2.2. Przyczyna zgonu

Kolejnymi kryteriami zastosowanymi do analizy wyników była przyczyna zgonu w postaci przyczyn chorobowych, w wyniku urazu, powieszenia, zatrucia oraz dla nieustalonej przyczyny zgonu. Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} osób zmarłych z przyczyn chorobowych przygotowano ryciny 4.19. i 4.20. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

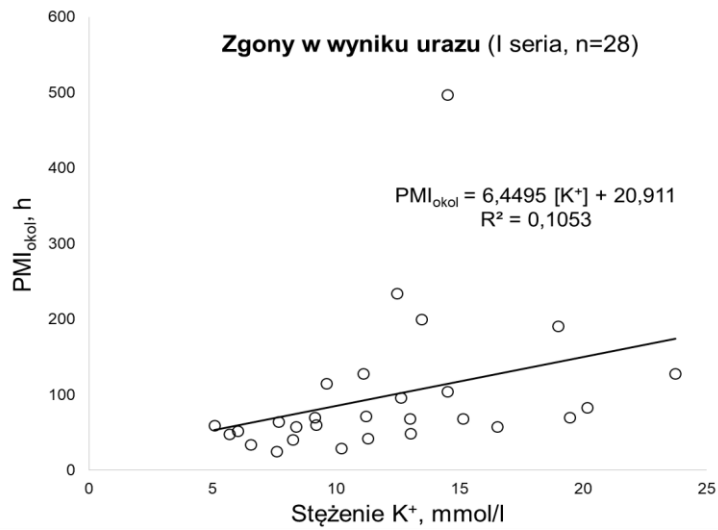


Ryc. 4.19. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ([K⁺]) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych z przyczyn chorobowych (n=35, tabela 4.7.)

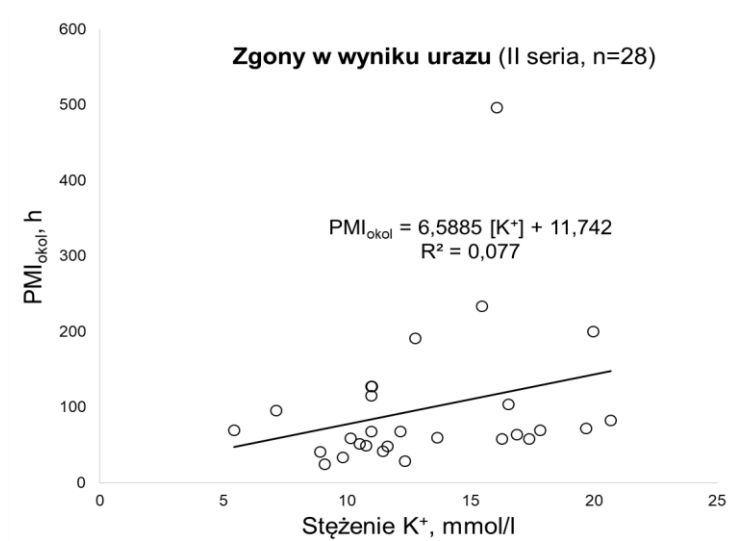


Ryc. 4.20. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ([K⁺]) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych z przyczyn chorobowych (n=34, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} osób zmarłych w wyniku urazu przygotowano ryciny 4.21. i 4.22. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

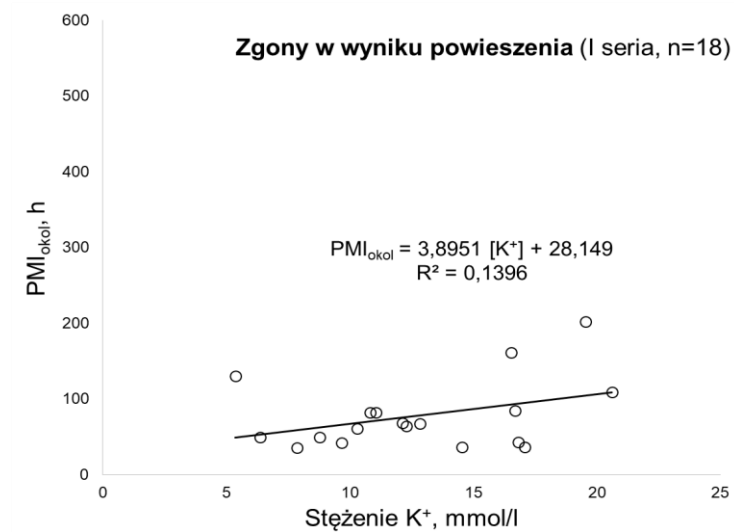


Ryc. 4.21. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych w wyniku urazu ($n=28$, tabela 4.7.)

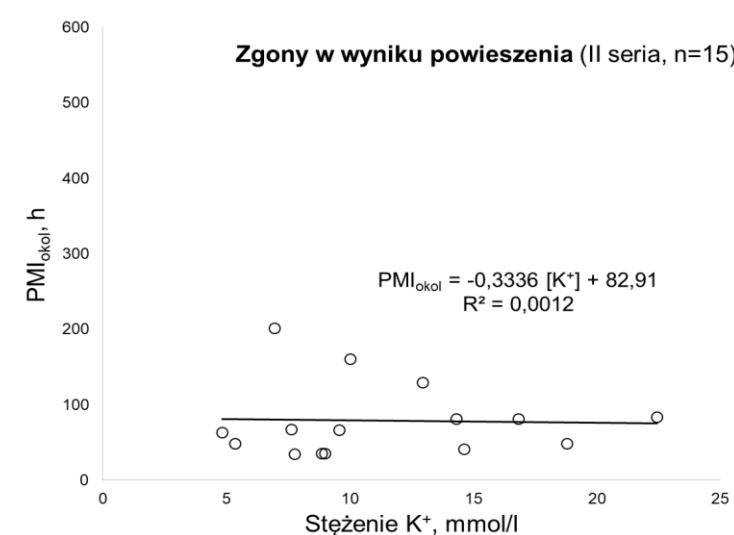


Ryc. 4.22. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych z przyczyn chorobowych ($n=34$, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} osób zmarłych w wyniku powieszenia przygotowano ryciny 4.23. i 4.24. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

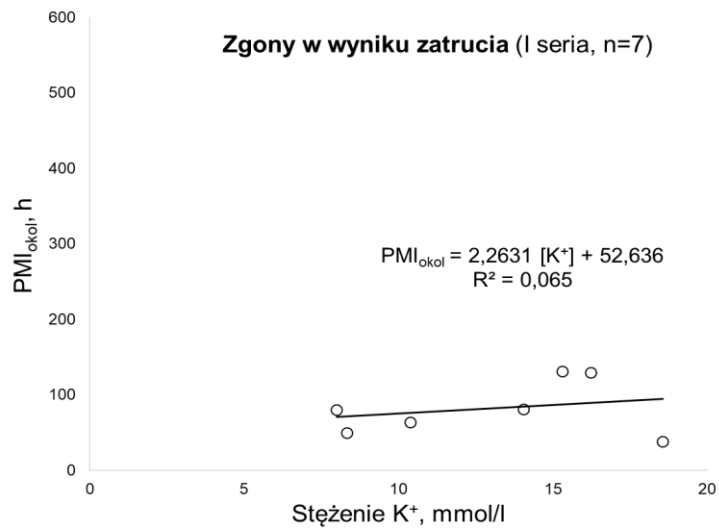


Ryc. 4.23. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych w wyniku powieszenia (n=18, tabela 4.7.)

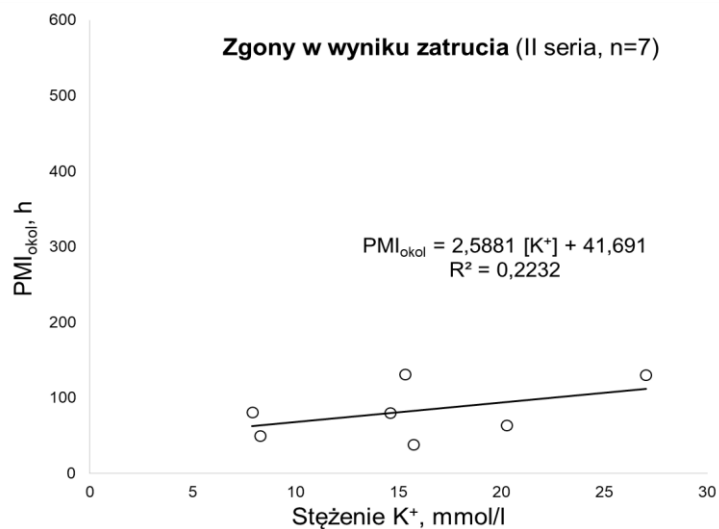


Ryc. 4.24. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych w wyniku powieszenia (n=15, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okol} osób zmarłych w wyniku zatrucia przygotowano ryciny 4.25. i 4.26. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.

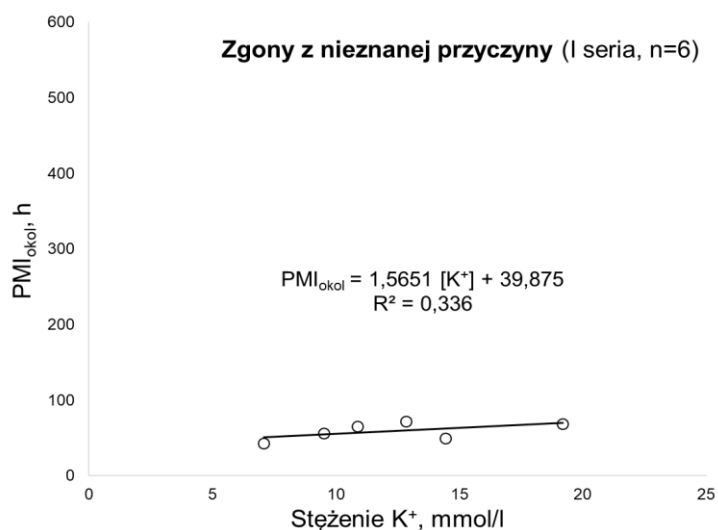


Ryc. 4.25. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych w wyniku zatrucia (n=7, tabela 4.7.)

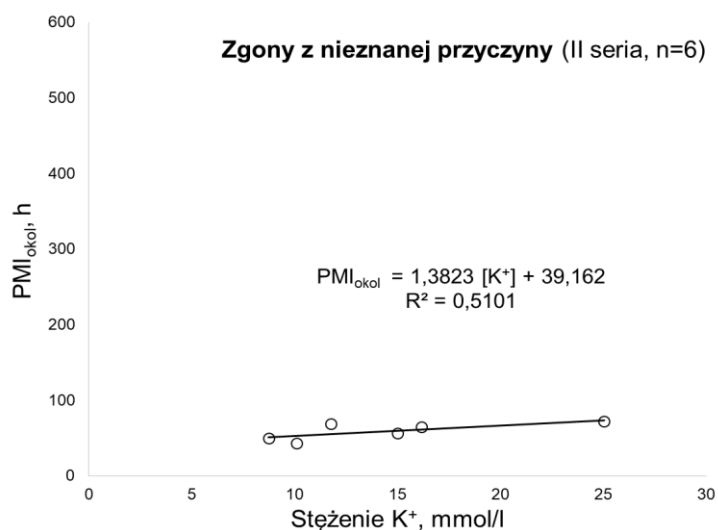


Ryc. 4.26. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych w wyniku zatrucia (n=7, tabela 4.7.)

Na podstawie podanych w tabeli 4.7. wyników pomiaru stężenia jonów potasu w ciecle szklistym oka oraz czasu zgonu PMI_{okoi} osób zmarłych z nieznannej przyczyny przygotowano ryciny 4.27. i 4.28. odpowiednio dla I i II serii pomiarowej.



Ryc. 4.27. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okoi}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciecle szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych z nieznannej przyczyny (n=6, tabela 4.7.)



Ryc. 4.28. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okoi}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciecle szklistym oka (II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów w grupie osób zmarłych z nieznannej przyczyny (n=6, tabela 4.7.)

5. Dyskusja wyników

5.1. Wybrane parametry walidacyjne metody

Pobieranie materiału biologicznego

Cało szkliste oka charakteryzuje się zwiększoną odpornością na autolizę niż krew. Opisany rodzaj materiału ma jednak ograniczenia związane ze stosunkowo dużą lepkością i niewielką objętością (do 2 ml). Pierwszym czynnikiem wpływającym na niepewność pomiaru są jony zakłócające, do których należą NH_4^+ , Li^+ , Na^+ i Ca^{2+} . Ze względu na powyższe aspekty w celu zmniejszenia efektu matrycy i interferencji innych w/w jonów oraz relatywnie niskie granice oznaczalności metod ISE i MIP-OES próbki rozcieńczono 80-krotnie.

Ważnym czynnikiem wpływającym na pomiar ISE jest temperatura otoczenia i układu pomiarowego, stąd w czasie badań temperatura była stała przez cały czas w zakresie 20–25 °C. Według producenta zakres temperatur pracy ISE wynosi od 0 do 40 °C, ale dotyczy on zastosowania metody potencjometrycznej. Utrzymanie pH środowiska pomiarowego również ma wpływ na pomiar, a pomiar ISE jest stabilny w zakresie 1,5–12,00 pH.

Próbki VH pobierano za pomocą metalowej, spiczastej igły (35 × 2 mm). Czas pobierania próbek różnił się w zależności od czasu trwania sekcji zwłok. Ciała zmarłych przechowywano w chłodniach sekcyjnych (4 °C) w różnym czasie, co mogło mieć wpływ na oznaczane wartości stężenia jonów potasu.

Niepewność pomiaru typu A i typu B

W niniejszej pracy podjęto próbę oszacowania składowych niepewności (typu A i B) związanych z przygotowaniem próbki i analizą instrumentalną za pomocą ISE i MIP-OES (tab. 5.1.).

Tab. 5.1. Zestawienie wyników budżetu niepewności typu A (eksperymentalna) i B (nieeksperymentalna) dla oznaczania stężenia jonów potasu metodami ISE i MIP-OES

Stężenie K ⁺	Niepewność rozszerzona (%)			
	ISE		MIP-OES	
	U _A	U _B	U _A	U _B
Niskie (2 mg/l)	±12.2	±4.75	±1.2	±2.53
Średnie (10 mg/l)	±6.1	±4.75	±2.2	±2.53
Wysokie (25 mg/l)	±3.1	±4.75	±2.5	±2.53

Oszacowane wartości niepewności rozszerzonej wyznaczone metodą doświadczalną A (U_A) wskazują na kilka do nawet dziesięciokrotnie mniejszą niepewność oznaczenia stężenia jonów potasu w przypadku metody MIP-OES. Podobnie w przypadku szacowania niepewności rozszerzonej metodą B (U_B), metoda MIP-OES charakteryzuje się dwukrotnie mniejszą niepewnością.

Na podstawie zdobytego doświadczenia w oznaczaniu stężenia jonów potasu metodami ISE i MIP-OES w tabeli 5.2. zestawiono ich zalety i ograniczenia, które warto rozważyć przed wdrożeniem ich do praktyki diagnostycznej.

Tab. 5.2. Zalety i wady metody elektrody jonoselektywnej (ISE) i plazmy indukowanej mikrofalowo optycznej spektrometrii emisyjnej (MIP-OES)

Metoda	Zalety	Wady
ISE	<ul style="list-style-type: none"> • Wysoka selektywność względem jonów potasu • Szeroki zakres pH w roztworach wodnych (od 2,5 do 11) • Szeroki zakres stężeń jonów potasu (od 10–6 mol/l do 1 mol/l lub od 0,04 mg/l do 39 000 mg/l) • Prosta i bezpośrednia analiza • Niskie koszty sprzętu i analiz • Pomiar nieniszczący • Stosunkowo mała ilość wymaganych próbek 	<ul style="list-style-type: none"> • Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ) nie są tak dobre jak inne techniki (np. optyczna spektrometria emisyjna) • Problemy spowodowane zakłóceniami. Jeśli elektroda jest narażona na wysokie stężenia jonów zakłócających, może wystąpić dryft i długi czas reakcji. Popularne kationy, takie jak Cs⁺, NH₄⁺, Tl⁺, H⁺, Ag⁺, Tris⁺ (kation tris(hydroksymetylo)aminometanu), Li⁺ i Na⁺ mogą powodować błąd do 10% dla różnych poziomów stężenia jonów potasu • Zmiany temperatury wpływają na potencjał elektrody. Z tego powodu zarówno próbki, jak i roztwory wzorcowe nie powinny różnić się temperaturą o więcej niż ±1 °C. Przy stężeniu potasu 10–3 mol/l różnica temperatur 1°C powoduje błąd większy niż 2,5% • Nie można go używać przez długi czas ze względu na degradację membrany (rzeczywisty czas życia modułu ISE wynosi około sześciu miesięcy). Jeśli membrana jest uszkodzona, odpowiedź potencjometru staje się bardzo powolna lub nachylenie krzywej kalibracji znacznie się zmniejsza (moduł ISE należy wymienić)
MIP-OES	<ul style="list-style-type: none"> • Pomimo problemów z selektywnością, możliwość 	<ul style="list-style-type: none"> • Wąski zakres analizy (od 0,1 mg/l do 100 mg/l dla regularnie używanych długości fal:

Metoda	Zalety	Wady
	<p>wykonywania pomiarów w kilku zakresach spektralnych</p> <ul style="list-style-type: none"> • Możliwość wykonywania analiz w szerszym zakresie dla alternatywnych długości fal (od 20 mg/l do 1000 mg/l dla 404,414 nm, 344,738 nm, 404,721 nm i 693,877 nm) • Niski koszt rutynowej analizy - Bardzo prosta i zautomatyzowana analiza - Wymagana mała objętość próbek (1–3 ml) • Umiarkowanie mały wpływ temperatury na wynik analizy • Możliwość wykonania szerokiego zakresu analiz elementarnych podczas jednego pomiaru 	<p>766,491 nm i 769,897 nm) w porównaniu z innymi metodami wykorzystującymi plazmę</p> <ul style="list-style-type: none"> • Możliwe występowanie interferencji widmowych od innych pierwiastków (La - 766,434 nm i Yb - 769,949 dla najczęściej używanych długości fal) • Średnio wysokie koszty aparatury • Pomiar niszczący próbkę • Ograniczenia związane z oznaczaniem pierwiastków o wysokich potencjałach jonizacji

Niepewność oznaczenia związana ściśle z metodami ISE i MIP-OES jest stosunkowo niewielka w odniesieniu do pozostałych czynników wpływających na stężenie jonów potasu (przyczyna zgonu, temperatura otoczenia, warunki przechowywania zwłok). Jednak na podstawie przeprowadzonych badań niepewność typu A (eksperymentalna) dla niskich stężeń (2 mg/l) jonów potasu może sięgać nawet 12,2% przy zastosowaniu metody ISE. Zmniejszenie niepewności szacowania PMI można przeprowadzić poprzez wprowadzenie dodatkowych wskaźników określających czas zgonu.

5.2. Analiza przypadków sekcyjnych

Na podstawie wyników przedstawionych w rozdziale 4 (seria I i II) poniżej w tabeli 5.3. zestawiono wartości współczynników determinacji (R^2) oraz równań regresji liniowej PMI_{okol} w funkcji stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka dopasowanych metodą sumy najmniejszych kwadratów. Każda seria pomiarowa (I i II) wymieniona w tabeli 5.3. dała podstawę do wyznaczenia średniego stężenia jonów potasu z trzech pomiarów. W przypadku sumy dwóch serii pomiarowych (suma „I + II” wymieniona w tabeli 5.3.) podano współczynniki wyznaczone na podstawie średniego stężenia jonów potasu z sześciu pomiarów, natomiast liczba „n” odnosi się do liczby przypadków zgonów.

Tab. 5.3. Wartości współczynników determinacji (R^2) oraz współczynników równań regresji liniowej PMI_{okol} w funkcji stężenia jonów potasu ($PMI_{okol} = a [K^+] + b$) w ciele szklistym oka

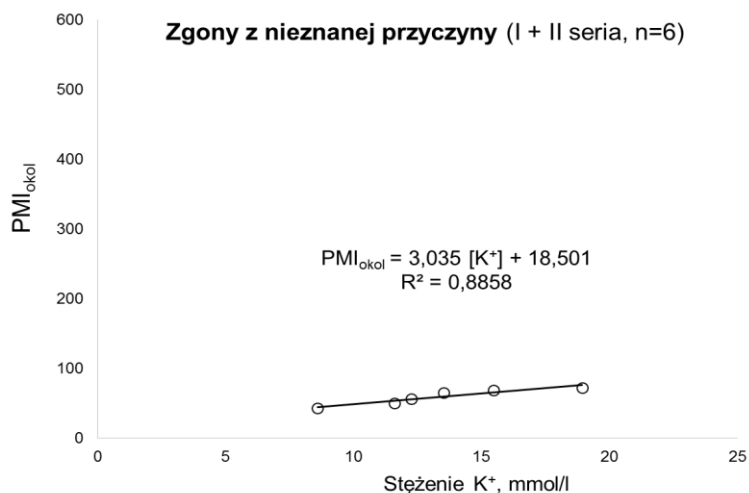
Lp.	Opis	Seria	n	a	b	R^2
1	wszystkie przypadki zgonów	I	94	3,75	41,43	0,0782
2	wszystkie przypadki zgonów	II	90	1,84	65,92	0,0171
3	wszystkie przypadki zgonów	I + II	94	4,44	32,20	0,0652
4	zgony kobiet	I	18	6,33	24,15	0,0578
5	zgony kobiet	II	17	12,59	-45,92	0,1378
6	zgony kobiet	I + II	18	16,37	-92,59	0,1623
7	zgony mężczyzn	I	76	3,46	41,91	0,1107
8	zgony mężczyzn	II	73	1,04	73,34	0,0098
9	zgony mężczyzn	I + II	76	3,58	39,47	0,0747
10	zgony w grupie wiekowej 15-30 lat	I	22	4,66	28,56	0,1405
11	zgony w grupie wiekowej 15-30 lat	II	20	1,42	72,74	0,0168
12	zgony w grupie wiekowej 15-30 lat	I + II	22	4,96	24,36	0,1016
13	zgony w grupie wiekowej 31-45 lat	I	24	3,69	31,41	0,2097
14	zgony w grupie wiekowej 31-45 lat	II	23	2,53	51,52	0,0787
15	zgony w grupie wiekowej 31-45 lat	I + II	24	4,65	22,12	0,2057
16	zgony w grupie wiekowej 46-60 lat	I	24	2,77	37,87	0,1632
17	zgony w grupie wiekowej 46-60 lat	II	24	-0,40	76,10	0,0032
18	zgony w grupie wiekowej 46-60 lat	I + II	24	2,62	38,27	0,0664
19	zgony w grupie wiekowej 61-99 lat	I	23	3,10	78,99	0,0224
20	zgony w grupie wiekowej 61-99 lat	II	22	1,64	96,01	0,0052
21	zgony w grupie wiekowej 61-99 lat	I + II	23	3,02	78,49	0,0157
22	zgony z przyczyn chorobowych	I	35	2,52	61,20	0,0615
23	zgony z przyczyn chorobowych	II	34	0,36	89,91	0,0008
24	zgony z przyczyn chorobowych	I + II	35	2,53	62,17	0,0327
25	zgony w wyniku urazu	I	28	6,45	20,91	0,1053
26	zgony w wyniku urazu	II	28	6,59	11,74	0,0770
27	zgony w wyniku urazu	I + II	28	9,38	-19,45	0,1314
28	zgony w wyniku powieszenia	I	18	3,90	28,15	0,1396
29	zgony w wyniku powieszenia	II	15	-0,33	82,91	0,0012
30	zgony w wyniku powieszenia	I + II	18	2,81	42,86	0,0501
31	zgony w wyniku zatrucia	I	7	2,26	52,64	0,0650
32	zgony w wyniku zatrucia	II	7	2,59	41,69	0,2232
33	zgony w wyniku zatrucia	I + II	7	3,83	27,29	0,2202
34	zgony z nieznannej przyczyny	I	6	1,57	39,88	0,3360
35	zgony z nieznannej przyczyny	II	6	1,38	39,16	0,5101
36	zgony z nieznannej przyczyny	I + II	6	3,04	18,50	0,8858
37	trzeźwi (poniżej 0,2 promila)	I	65	3,39	50,20	0,0490
38	trzeźwi (poniżej 0,2 promila)	II	65	2,25	63,50	0,0218
39	trzeźwi (poniżej 0,2 promila)	I+II	65	4,30	37,13	0,0511

Lp.	Opis	Seria	n	a	b	R ²
40	po użyciu alkoholu i nietrzeźwi (0,2 promila i więcej)	I	29	4,74	19,05	0,2717
41	po użyciu alkoholu i nietrzeźwi (0,2 promila i więcej)	II	29	0,42	76,83	0,0016
42	po użyciu alkoholu i nietrzeźwi (0,2 promila i więcej)	I + II	29	4,69	22,11	0,1435
43	0,2-0,7 promila alkoholu	I	9	8,69	-34,16	0,6116
44	0,2-0,7 promila alkoholu	II	9	3,02	71,60	0,0431
45	0,2-0,7 promila alkoholu	I + II	9	8,28	-9,37	0,3500
46	0,8-3,0 promila alkoholu	I	13	0,51	68,27	0,0052
47	0,8-3,0 promila alkoholu	II	13	-0,74	84,08	0,0128
48	0,8-3,0 promila alkoholu	I + II	13	-0,29	77,50	0,0010
49	powyżej 3,0 promila alkoholu	I	7	-1,61	85,15	0,0465
50	powyżej 3,0 promila alkoholu	II	7	-2,24	85,70	0,0857
51	powyżej 3,0 promila alkoholu	I + II	7	-3,00	98,35	0,1006
52	znany czas ujawnienia zwłok	I	67	3,75	41,15	0,0745
53	znany czas ujawnienia zwłok	II	65	2,36	61,50	0,0275
54	znany czas ujawnienia zwłok	I + II	67	5,03	24,54	0,0787
55	znany czas zgonu	I	26	4,00	37,67	0,0850
56	znany czas zgonu	II	25	0,37	78,32	0,0008
57	znany czas zgonu	I + II	26	3,17	44,63	0,0348
Minimum				-3,00	-92,59	0,0008
Maksimum				16,37	98,35	0,8858
Średnia				3,30	43,85	0,1172
Mediana				3,02	41,69	0,0745

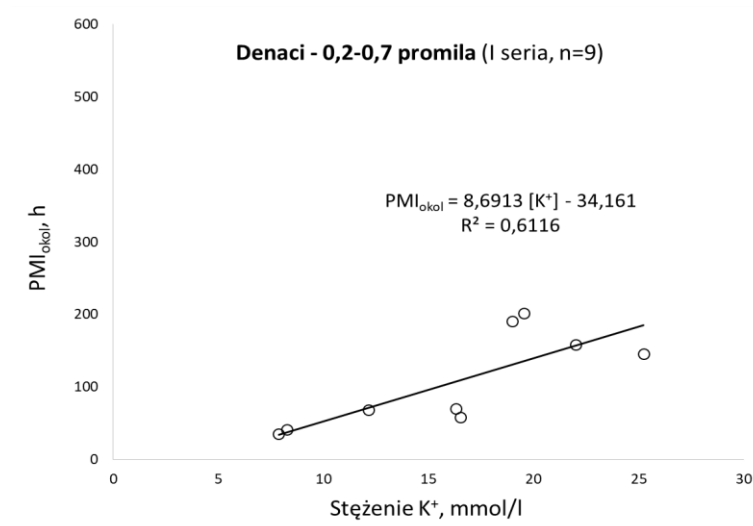
Współczynnik determinacji pozwala na oszacowanie jakości dopasowania modelu liniowego do analizowanych danych (im bliższa jedności tym lepsze dopasowanie zmiennych do linii prostej), jednak jego użyteczność może być ograniczona, jeśli dane nie należą do modelu liniowego. W związku z dużymi różnicami współczynników równań regresji liniowej i determinacji (a, b, R²) oszacowana w tabeli 5.3. wartość średnia i mediana ma charakter orientacyjny. Na rycinie 5.1. przedstawiono dane i wykres regresji z pkt. 36 tabeli 5.3. („zgony z nieznaną przyczyną” dla średniej z sześciu wyników dwóch serii pomiarowych I i II), dla której uzyskano najlepszy współczynnik determinacji R² o wartości zbliżonej do jedności (0,8858). Na rycinie 5.2. przedstawiono dane i wykres regresji z pkt. 43 tabeli 5.3. („0,2-0,7 promila alkoholu” dla średniej z trzech wyników I serii pomiarowej), dla której uzyskano drugi najwyższy współczynnik determinacji R² (0,6116) i wartości „a” i „b” zbliżone do literaturowych.

Jednak w obu przypadkach wystąpiła mała liczba przypadków zgonów (odpowiednio 6 i 9 przypadków), co nie daje podstaw do uogólnienia wniosku.

Niemal wszystkie współczynniki regresji liniowej PMI wskazują na trend rosnący (co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa), jednak współczynniki determinacji są dalekie od jedności. Na podstawie wcześniej przedstawionego przeglądu piśmiennictwa należało się spodziewać wartości współczynników równania $PMI = a[K^+] + b$ w zakresach w przypadku współczynnika nachylenia prostej „a” od 1,08 do 7,04 (średnio 4,96) a w przypadku wyrazu wolnego „b” (wskazującego na ewentualny błąd systematyczny) w zakresie od -2,82 do -47,10 (średnio -26,96). Analiza wyników zestawionych w tabeli 5.3. wskazuje, że zbliżone do danych literaturowych dla współczynnika nachylenia prostej „a” są prawie wszystkie analizowane grupy denatów (średnio 3,80) z wyjątkiem m.in. zgonów kobiet (pkt. 5 i 6), zgonów w grupie wiekowej 46-60 lat (pkt. 17) i zgonów z przyczyn chorobowych (pkt. 23). Analiza wyników zestawionych w tabeli 5.3. wskazuje, że zbliżone do danych literaturowych dla wyrazu wolnego „b” są zgony w grupie kobiet (pkt. 5 i 6) oraz zgony w wyniku urazu (pkt. 27).



Ryc. 5.1. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w ciele szklistym oka (łącznie I i II seria pomiarowa) dla przypadków zgonów nieznannej przyczyny ($n=6$, tabela 5.3.)



Ryc. 5.2. Czas zgonu wynikający z okoliczności zdarzenia (PMI_{okol}) w funkcji stężenia jonów potasu ($[K^+]$) w cieple szklistym oka (I seria pomiarowa) dla przypadków zgonów denatów przy stwierdzonym stężeniu 0,2-0,7 promila alkoholu (n=9, tabela 5.3.)

6. Wnioski

Przeprowadzone badania dotyczące oszacowania czasu zgonu na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka dla potrzeb medycyny sądowej pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- a) Opracowana procedury oznaczania stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka metodami ISE i MIP-OES (tab. 3.3.) znalazły praktyczne zastosowanie zgodne z założonym celem badań.
- b) Wykazano, iż pośmiertne stężenie jonów potasu w ciele szklistym oka ($n=94$) wzrasta w czasie do 4 dni (w zakresie 15-99 h) od chwili zgonu, przy czym duże fluktuacje poszczególnych wyników pomiarów wskazują na dużą niepewność tego szacowania, którego źródło może mieć charakter zarówno analityczny (np. lepkość próbki, konieczność rozcieńczenia, uszkodzenie membrany elektrody jonoselektywnej, ograniczona selektywność oznaczenia) jak i pozaanalityczny (np. wiek, płeć, przyczyna zgonu, temperatura zwłok i otoczenia w czasie od chwili zgonu do sekcji zwłok)
- c) Oszacowania niepewności oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka metodą ISE oraz MIP-OES nie przekraczają wartości 12,2%, co może świadczyć o przydatności obu metod do szacowania niepewności pomiaru stężenia jonów potasu. Mniejszą niepewnością charakteryzują się oznaczenia stężeń jonów potasu wykonane metodą MIP-OES, w których dla stężeń niskich potasu (2 mg/l), średnich (10 mg/l) oraz wysokich (25 mg/l) uzyskano niepewność rozszerzoną odpowiednio $\pm 1,2$, $\pm 2,2$ i $\pm 2,5$ %, natomiast dla tych samych stężeń w metodzie ISE uzyskano niepewność rozszerzoną odpowiednio $\pm 12,2$, $\pm 6,1$ i $\pm 3,1$ %.
- d) Składowe niepewności oznaczenia stężenia jonów potasu związane z metodami ISE i MIP-OES są stosunkowo niewielkie w odniesieniu do pozostałych czynników wpływających na stężenie jonów potasu (płeć, wiek, przyczyna zgonu, temperatura otoczenia, warunki przechowywania zwłok).
- e) W celu zminimalizowania ryzyka uzyskania wyników niedokładnych postulowana jest częsta kalibracja urządzeń pomiarowych ISE i MIP-OES, kontrola parametrów pracy oraz udział w badaniach biegłości i/lub międzylaboratoryjnych.

- f) Zmniejszenie niepewności szacowania stężenia jonów potasu oraz wyznaczanego czasu zgonu można przeprowadzić poprzez wprowadzenie dodatkowych wskaźników określających czas zgonu (np. metodą klasyczną poprzez dodatkowo temperatury zwłok i otoczenia).

7. Piśmiennictwo

- [1] G. Teresiński (red.), „Medycyna sądowa. 1 Tanatologia i traumatologia sądowa”, Warszawa: PZWL, 2019, pp. 118–162.
- [2] B. Madea, “Methods for determining time of death,” *Forensic Sci Med Pathol*, vol. 12, no. 4, pp. 451–485, 2016, doi: 10.1007/s12024-016-9776-y.
- [3] S. Zięba, M. Wiergowski, M. Krzyżanowska, T. Gos, and I. Sołtyszewski, “Time of death estimation based on the analysis of tanathochemical processes in forensic medicine,” *Romanian Journal of Legal Medicine*, vol. 29, no. 3, pp. 261–271, Sep. 2021, doi: 10.4323/rjlm.2021.261.
- [4] Y. Charunyanont, A. Tubtimrattana, N. Tansrisawad, and P. Thirati, “Effect of body refrigeration on the postmortem formation of gamma hydroxybutyrate in whole blood,” *Forensic Sci Int*, vol. 334, May 2022, doi: 10.1016/j.forsciint.2022.111247.
- [5] T. Küting, B. Madea, C. Hess, and M. Krämer, “Comparative Study: Postmortem Long-Term Stability of Endogenous GHB in Cardiac Blood, Femoral Blood, Vitreous Humor, Cerebrospinal Fluid and Urine with and without Sodium Fluoride Stabilization,” *J Anal Toxicol*, vol. 46, no. 5, pp. 519–527, Jun. 2022, doi: 10.1093/jat/bkab042.
- [6] V. Poovaragavan *et al.*, “Estimation of Time Since Death Using Biochemical Markers in Synovial Fluid,” *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, vol. 44, no. 3, pp. 183–187, Sep. 2023, doi: 10.1097/PAF.0000000000000861.
- [7] M. Febrero Bande, L. Ordóñez Mayán, C. Cordeiro, D. N. Vieira, and J. I. Muñoz Barús, “IPMICALC: an Integrated Post-mortem Interval Calculator,” *Forensic Sci Med Pathol*, 2022, doi: 10.1007/s12024-022-00537-7.
- [8] E. Locci *et al.*, “PMI estimation through metabolomics and potassium analysis on animal vitreous humour,” *Int J Legal Med*, vol. 137, no. 3, pp. 887–895, May 2023, doi: 10.1007/s00414-023-02975-6.
- [9] A. Chighine *et al.*, “Metabolomics investigation of post-mortem human pericardial fluid,” *Int J Legal Med*, 2023, doi: 10.1007/s00414-023-03050-w.
- [10] K. Sakurada *et al.*, “Production of γ -hydroxybutyric acid in postmortem liver increases with time after death,” *Toxicol Lett*, vol. 129, no. 3, pp. 207–217, 2002, doi: 10.1016/S0378-4274(02)00019-X.
- [11] A. L. Castro, S. Tarelho, M. Dias, F. Reis, and H. M. Teixeira, “Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval,” *Int J Legal Med*, vol. 130, no. 4, pp. 959–965, 2016, doi: 10.1007/s00414-016-1321-8.
- [12] H. V. Chandrakanth, T. Kanchan, B. M. Balaraj, H. S. Virupaksha, and T. N. Chandrashekar, “Postmortem vitreous chemistry-An evaluation of sodium,

- potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death),” *J Forensic Leg Med*, vol. 20, no. 4, pp. 211–216, 2013, doi: 10.1016/j.jflm.2012.09.001.
- [13] A. Go *et al.*, “Analysis of hypoxanthine and lactic acid levels in vitreous humor for the estimation of post-mortem interval (PMI) using LC–MS/MS,” *Forensic Sci Int*, vol. 299, pp. 135–141, 2019, doi: 10.1016/j.forsciint.2019.03.024.
- [14] B. Madea, “Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry?,” *Forensic Sci Int*, vol. 151, no. 2–3, pp. 139–149, 2005, doi: 10.1016/j.forsciint.2005.01.013.
- [15] M. L. C. Passos *et al.*, “Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system,” *Talanta*, vol. 79, no. 4, pp. 1094–1099, 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2009.02.054.
- [16] C. Cordeiro, L. Ordóñez-Mayán, E. Lendoiro, M. Febrero-Bande, D. N. Vieira, and J. I. Muñoz-Barús, “A reliable method for estimating the postmortem interval from the biochemistry of the vitreous humor, temperature and body weight,” *Forensic Sci Int*, vol. 295, pp. 157–168, 2019, doi: 10.1016/j.forsciint.2018.12.007.
- [17] B. Zilg, S. Bernard, K. Alkass, S. Berg, and H. Druid, “A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature,” *Forensic Sci Int*, vol. 254, pp. 158–166, 2015, doi: 10.1016/j.forsciint.2015.07.020.
- [18] S. Srettabunjong, W. Thongphap, and A. Chittamma, “Comparative and Correlation Studies of Biochemical Substances in Vitreous Humor and Synovial Fluid,” *J Forensic Sci*, vol. 64, no. 3, pp. 778–785, 2019, doi: 10.1111/1556-4029.13966.
- [19] M. Yang *et al.*, “A Study on the Estimation of Postmortem Interval Based on Environmental Temperature and Concentrations of Substance in Vitreous Humor,” *J Forensic Sci*, vol. 63, no. 3, pp. 745–751, 2018, doi: 10.1111/1556-4029.13615.
- [20] N. K. Tumram, V. N. Ambade, and A. P. Dongre, “Thanatochemistry: Study of vitreous humor potassium,” *Alexandria Journal of Medicine*, vol. 50, no. 4, pp. 365–368, 2014, doi: 10.1016/j.ajme.2013.12.002.
- [21] L. K. Adelson L, Sunshine I, Lindfors R, “Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval,” *J. Forensic Sci.*, vol. 8, pp. 503–514, 1963.
- [22] J. M. Bohra B, Verma R, Mathur IB, Sharma Y, Khangwal VP, “Estimation of postmortem interval by measuring potassium level in vitreous humor,” *J. Indian Acad. Forensic Med*, vol. 36, pp. 374–378, 2014.
- [23] F. Bortolotti, J. P. Pascali, G. G. Davis, F. P. Smith, R. M. Brissie, and F. Tagliaro, “Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis,” *Med Sci Law*, vol. 51, no. SUPPL. 1, 2011, doi: 10.1258/msl.2010.010063.

- [24] Coe JI., "Postmortem chemistries on human vitreous humor," *Am. J. Clin. Pathol.*, 1969.
- [25] S. N. Foster, P. R. Smith, M. Biggs, G. N. Ruttly, F. E. Hollingbury, and S. R. Morley, "Estimation of postmortem interval using vitreous potassium levels in cases of fatal road traffic collision," *Arch Med Sadowej Kryminol*, vol. 66, no. 2, pp. 71–82, Jan. 2016, doi: 10.5114/amsik.2016.63866.
- [26] U. U. L. R. L. K. Hansson L, "Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death," *J. Forensic Sci.*, vol. 11, pp. 390–394, 1966.
- [27] K. D. Jashnani, S. A. Kale, and A. B. Rupani, "Vitreous humor: Biochemical constituents in estimation of postmortem interval," *J Forensic Sci*, vol. 55, no. 6, pp. 1523–1527, 2010, doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01501.x.
- [28] B. Madea, C. Henssge, W. Hönig, and A. Gerbracht, "References for determining the time of death by potassium in vitreous humor," *Forensic Sci Int*, vol. 40, no. 3, pp. 231–243, 1989, doi: 10.1016/0379-0738(89)90181-3.
- [29] B. C. McCleskey, D. W. Dye, and G. G. Davis, "Review of Postmortem Interval Estimation Using Vitreous Humor: Past, Present, and Future," *Acad Forensic Pathol*, vol. 6, no. 1, pp. 12–18, 2016, doi: 10.23907/2016.002.
- [30] Z. Mihailovic, T. Atanasijevic, V. Popovic, M. B. Milosevic, and J. P. Spherhake, "Estimation of the postmortem interval by analyzing potassium in the vitreous humor: Could repetitive sampling enhance accuracy?," *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, vol. 33, no. 4, pp. 400–403, 2012, doi: 10.1097/PAF.0b013e31826627d0.
- [31] J. I. Muñoz Barús *et al.*, "Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging," *Forensic Sci Int*, vol. 125, no. 1, pp. 67–74, 2002, doi: 10.1016/S0379-0738(01)00616-8.
- [32] A. S. Murthy, S. Das, H. K. Thazhath, V. A. Chaudhari, and P. S. Adole, "The effect of cold chamber temperature on the cadaver's electrolyte changes in vitreous humor and plasma," *J Forensic Leg Med*, vol. 62, no. September 2018, pp. 87–91, 2019, doi: 10.1016/j.jflm.2019.01.012.
- [33] R. Rathinam *et al.*, "Vitreous potassium concentration as a predictor of postmortem interval in injury (trauma) cases: A cross-sectional study from a tertiary care center in rural Haryana," *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*, vol. 8, no. 3, pp. 315–318, 2015, doi: 10.4103/0975-2870.157072.
- [34] T. O. Rognum *et al.*, "Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature," *Forensic Sci Int*, vol. 262, pp. 160–165, 2016, doi: 10.1016/j.forsciint.2016.03.001.
- [35] T. O. Rognum, S. Hauge, S. Øyasaeter, and O. D. Saugstad, "A new biochemical method for estimation of postmortem time," *Forensic Sci Int*, vol. 51, no. 1, pp. 139–146, 1991, doi: 10.1016/0379-0738(91)90214-4.

- [36] A. K. Siddhamsetty, S. K. Verma, A. Kohli, A. Verma, D. Puri, and A. Singh, "Exploring time of death from potassium, sodium, chloride, glucose & calcium analysis of postmortem synovial fluid in semi arid climate," *J Forensic Leg Med*, vol. 28, pp. 11–14, 2014, doi: 10.1016/j.jflm.2014.09.004.
- [37] R. J. Stephen, "Vitreous humor chemistry. The use of potassium concentration for the prediction of postmortem interval," *The Journal of Forensic Sciences*, vol. 32, pp. 503–509, 1987.
- [38] R. Swain *et al.*, "Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry," *J Forensic Leg Med*, vol. 36, pp. 144–148, 2015, doi: 10.1016/j.jflm.2015.09.017.
- [39] B. Zhou, L. Zhang, G. Zhang, X. Zhang, and X. Jiang, "The determination of potassium concentration in vitreous humor by low pressure ion chromatography and its application in the estimation of postmortem interval," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 852, no. 1–2, pp. 278–281, 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2007.01.027.
- [40] W. Q. Sturmer, "The Vitreous Humour: Postmortem Potassium Changes," *The Lancet*, vol. 281, no. 7285, pp. 807–808, 1963, doi: 10.1016/S0140-6736(63)91509-5.
- [41] A. S. Dias, A. L. Castro, P. Melo, S. Tarelho, P. Domingues, and J. M. Franco, "A fast method for GHB-GLUC quantitation in whole blood by GC-MS/MS (TQD) for forensic purposes," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 150, pp. 107–111, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.072.
- [42] H. Nishimura, F. Moriya, and Y. Hashimoto, "Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period," *Forensic Toxicol*, vol. 27, no. 2, pp. 55–60, 2009, doi: 10.1007/s11419-009-0067-0.
- [43] G. Prieto-Bonete, I. Legaz, C. Pérez-Martínez, M. D. Pérez-Cárceles, and A. Luna, "Biochemical correction factors to estimation of post-mortem interval in vitreous humor," *Romanian Journal of Legal Medicine*, vol. 25, no. 2, pp. 201–204, 2017, doi: 10.4323/rjlm.2017.201.
- [44] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, and B. Ludes, "GHB in postmortem toxicology: Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens," *Forensic Sci Int*, vol. 143, no. 2–3, pp. 177–181, 2004, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.02.036.
- [45] A. E. Donaldson and I. L. Lamont, "Biochemistry changes that occur after death: Potential markers for determining post-mortem interval," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082011.
- [46] F. Busardo and A. Jones, "GHB Pharmacology and Toxicology: Acute Intoxication, Concentrations in Blood and Urine in Forensic Cases and Treatment of the Withdrawal Syndrome," *Curr Neuropharmacol*, vol. 13, no. 1, pp. 47–70, 2014, doi: 10.2174/1570159x13666141210215423.

- [47] F. P. Busardò *et al.*, “Stability of endogenous GHB in vitreous humor vs peripheral blood in dead bodies,” *Forensic Sci Int*, vol. 274, no. 2016, pp. 64–69, 2017, doi: 10.1016/j.forsciint.2016.12.025.
- [48] S. P. Elliott, “Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production,” *Forensic Sci Int*, vol. 133, no. 1–2, pp. 9–16, 2003, doi: 10.1016/S0379-0738(03)00043-4.
- [49] J. Markowska, M. Szopa, M. Zawadzki, and W. Piekoszewski, “Ciało szkliste okarutynowy czy alternatywny materiał do badań w medycynie sądowej Vitreous humour-routine or alternative material for analysis in forensic medicine,” *Arch Med Sadowej Kryminol*, vol. 67, no. 3, pp. 201–213, 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.5114/amsik.2017.73192>
- [50] F. Moriya and Y. Hashimoto, “Endogenous γ -hydroxybutyric acid levels in postmortem blood,” *Leg Med*, vol. 6, no. 1, pp. 47–51, 2004, doi: 10.1016/j.legalmed.2003.09.004.
- [51] A. Mulla, K. L. Massey, and J. Kalra, “Vitreous humor biochemical constituents: Evaluation of between-eye differences,” *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, vol. 26, no. 2, pp. 146–149, 2005, doi: 10.1097/01.paf.0000164001.50097.4c.
- [52] H. Andresen-Streichert *et al.*, “Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs,” *Int J Legal Med*, vol. 129, no. 1, pp. 57–68, 2015, doi: 10.1007/s00414-014-1051-8.
- [53] F. P. Busardò, F. Portelli, A. Montana, M. C. Rotolo, S. Pichini, and E. Maresi, “When a death apparently associated to sexual assault is instead a natural death due to idiopathic hypereosinophilic syndrome: The importance of gamma-hydroxybutyric acid analysis in vitreous humor,” *Leg Med*, vol. 26, pp. 92–97, 2017, doi: 10.1016/j.legalmed.2017.04.001.
- [54] C. Palmiere and P. Mangin, “Urea nitrogen, creatinine, and uric acid levels in postmortem serum, vitreous humor, and pericardial fluid,” *Int J Legal Med*, vol. 129, no. 2, pp. 301–305, 2015, doi: 10.1007/s00414-014-1076-z.
- [55] F. P. Busardò *et al.*, “Assessment of the stability of exogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) in stored blood and urine specimens,” *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 19, no. 21, pp. 4187–4194, 2015.
- [56] F. Paolo Busardo and C. Kyriakou, “GHB in Biological Specimens: Which Cut-off Levels Should be Taken into Consideration in Forensic Toxicological Investigation?,” *Recent Pat Biotechnol*, vol. 8, no. 3, pp. 206–214, 2015, doi: 10.2174/1872208309666150504143155.
- [57] F. P. Busardò *et al.*, “Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples,” *Forensic Sci Int*, vol. 243, pp. 144–148, 2014, doi: 10.1016/j.forsciint.2014.07.019.

- [58] S. P. Elliott, "Further Evidence for the Presence of GHB in Postmortem Biological Fluid: Implications for the Interpretation of Findings," *J Anal Toxicol*, vol. 28, no. 1, pp. 20–26, 2004, doi: 10.1093/jat/28.1.20.
- [59] S. Elliott, P. Lowe, and A. Symonds, "The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid," *Forensic Sci Int*, vol. 139, no. 2–3, pp. 183–190, 2004, doi: 10.1016/j.forsciint.2003.10.018.
- [60] D. Singh, R. Prashad, C. Parkash, Y. S. Bansal, S. K. Sharma, and A. N. Pandey, "Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India," *Forensic Sci Int*, vol. 130, no. 1, pp. 1–7, 2002, doi: 10.1016/S0379-0738(02)00267-0.
- [61] J. I. Coe, "Vitreous potassium as a measure of the postmortem interval: An historical review and critical evaluation," *Forensic Sci Int*, vol. 42, no. 3, pp. 201–213, 1989, doi: 10.1016/0379-0738(89)90087-X.
- [62] M. Focardi *et al.*, "Improvement in estimation of time since death by albumin and potassium concentrations in vitreous humor," *Forensic Sci Int*, vol. 314, p. 110393, 2020, doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110393.
- [63] H. S. B. James RA, "Determination of post-mortem interval by sampling vitreous humor," *Am. J. Forensic. Med. Pathol.*, vol. 18, pp. 158–162, 1997.
- [64] H. A. Salam, E. A. Shaat, M. H. A. Aziz, A. A. MoneimSheta, and H. A. S. M. Hussein, "Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes," *Alexandria Journal of Medicine*, vol. 48, no. 4, pp. 335–344, 2012, doi: 10.1016/j.ajme.2012.05.004.
- [65] M. Guziński. Rozprawa doktorska pt. Opracowanie potencjometryczne czujnika i układu pomiarowego typu all-solid-state do oznaczania kationów ołowiu (II). Politechnika Gdańska Wydział Chemiczny Katedra Technologii Chemicznej, 2012, Gdańsk
- [66] J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz. Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska. Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, 1998, pp: 82-89
- [67] Przewodnik perfectION™. Potasowa elektroda kombinowana. Mettler Toledo, 2011.
- [68] ISE Theory Guide A Guide for Ion-Selective Electrodes Theory and Practice of ISE Applications Introduction. Mettler Toledo, 2018.
- [69] L. van de Velde, E. d'Angremont, and W. Olthuis, Solid contact potassium selective electrodes for biomedical applications – a review, *Talanta*, vol. 160. Elsevier B.V., pp. 56–65, Nov. 01, 2016. doi: 10.1016/j.talanta.2016.06.050.
- [70] N. Lenar and B. Paczosa-Bator, "Trendy w rozwoju i zastosowanie czujników potencjometrycznych Trends in design and ways of application of the potentiometric sensors," 2018. [Online]. Available: <http://analit.agh.edu.pl/>

- [71] B. Cieřlik and J. Płotka-Wasyłka, *Metody Spektroskopowe w Chemii Analitycznej*, Politechnika Gdańska, 2022.
- [72] A.E. Kitabchi, G.E. Umpierrez, J.M. Miles, J.N. Fisher, “Hyperglycemic Crises In Diabetes In Adult Patients, *Diabetes Care*, vol. 32, no. 7, July 2009. [Online]. Available: http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/27/suppl_1/s94/459629/zdc10104000s94.pdf
- [73] G. G. Sturner WQ, “The postmortem interval. A study of potassium in the vitreous humor,” *Am. J. Clin. Pathol*, 1964.
- [74] P. Konieczka, Szacowanie niepewności pomiaru analitycznego. Materiały pomocnicze do laboratorium z Chemii Analitycznej. Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.
- [75] EA, the European co-operation for Accreditation, “Evaluation of the Uncertainty of Measurement in calibration.”, 2022. [Online]. Available: <http://www.european-accreditation.org>
- [76] B. Jaroszek, Problemy oszacowania niepewności pomiarów biomedycznych, *Metrologia. Biuletyn Głównego Urzędu Miar*, Nr 3, vol. 6, 2011, s. 34-35.
- [77] Instruction Manual H014, H4114 potassium ion selective electrode, Hanna instruments, MAN4114, 07/06 REV3.
- [78] Agilent 4210 MP-AES. Specifications, Agilent Technologies, 2016.
- [79] “Agilent 4200 MP-AES Typical Performance 3 Sigma Detection limits. Agilent Technologies, 2016.