

**HORYZONTY NAUKI 2015
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 28 MAJA 2015**

**CHARAKTERYSTYKA ZAŻYCIOWYCH
I POŚMIERTNYCH PRZEMIAN KARBAMAZEPINY
ORAZ WYBRANYCH RODZAJÓW
ALTERNATYWNEGO MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO
NA POTRZEBY ANALIZ
TOKSYKOLOGICZNO-SĄDOWYCH**

**CHARACTERISTICS OF PERIMORTEM
AND POSTMORTEM TRANSFORMATIONS OF
CARBAMAZEPINE AND SELECTED ALTERNATIVE
BIOLOGICAL MATRICES FOR THE PURPOSE OF
FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSES**

Sofia Lendor

*Pracownia Chemii Sądowej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: sofia.lendor@gmail.com*

Abstract

Wprowadzenie

1. Karbamazepina: obszar zastosowań, dawki terapeutyczne i toksyczność
 - 1.1. Zażyciowe przemiany karbamazepiny w organizmie
 - 1.2. Metabolizm pośmiertny
2. Wybrane rodzaje materiałów biologicznych i ich pośmiertne przemiany
 - 2.1. Kości
 - 2.2. Maż gnilna
 - 2.3. Szpik kostny

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Sofia Lendor podjęła studia na kierunku chemia na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2010 roku. W 2013 rozpoczęła studia magisterskie o specjalności Chemia sądowa i konserwatorska. Obecnie przygotowuje się do obrony pracy magisterskiej na temat „Determination of psychoactive substances in human bone marrow by HPLC-MS and CE-MS”, do której badania prowadziła w Pracowni Chemii Sądowej. Jej zainteresowania naukowe obejmują między innymi analizę toksykologiczną substancji wykazujących właściwości psychoaktywne i środków odurzających w ludzkim materiale biologicznym, w szczególności

w sekcyjnych biologicznych materiałach alternatywnych.

ABSTRACT

This article is focused on the data concerning properties of carbamazepine, an antiepileptic drug commonly used in everyday medical practice but also frequently misused leading to many reported cases of intoxication. Due to high prevalence of this drug detailed data concerning its pharmacokinetics and pharmacodynamics can be found as well as metabolic paths that have been proven or have not been confirmed yet. For the purpose of toxicological analyses of samples collected postmortem it is also essential to know the possible transformations of an analyte due to microbial metabolism and postmortem changes of the sample matrix. In forensic cases of unavailable or unusable blood samples when advanced stage of decomposition processes in the found body occurs, alternative matrices are required. Presented review describes three types of such matrices: bones, bone marrow and grease in the context of their postmortem changes and suitability as the source of toxicological information.

Keywords: carbamazepine, postmortem metabolism, alternative biological matrices, bone marrow, bones

Słowa kluczowe: karbamazepina, metabolizm pośmiertny, alternatywne materiały biologiczne, szpik kostny, kości

WPROWADZENIE

Szerokie zastosowanie danego leku w praktyce lekarskiej wielokrotnie wiąże się z jego dużą dostępnością, a to z kolei może pociągać za sobą częste występowanie zatruć. Sytuacja taka ma miejsce w szczególności w przypadku leków oddziałujących na ośrodkowy układ nerwowy. Karbamazepina jest lekiem przeciwpadaczkowym, który odpowiada powyższemu opisowi, w związku z czym bardzo często stanowi substancję podlegającą oznaczeniom dla potrzeb toksykologii klinicznej i sądowej. Mnogość zanotowanych przypadków zatruć karbamazepiną stwarza możliwość dokładnego scharakteryzowania farmakokinetyki tego leku, a także procesów metabolicznych jakim podlega zarówno w organizmach żywych jak i pośmiertnie. Fakt dokładnego zbadania szlaków biotransformacji karbamazepiny powoduje z kolei konieczność poszukiwania efektywnych metod izolacji i oznaczania tego leku obok jego wielu metabolitów, wśród których występują także substancje aktywne farmakologicznie. Dodatkowe źródło informacji do badań mogą stanowić alternatywne materiały biologiczne, w szczególności w przypadkach zaawansowanego rozkładu gnilnego ciała. Analiza tych materiałów wymaga specjalnego podejścia i może przyczynić się zarówno do korzystnego poszerzenia wiedzy na temat badanego przypadku, jak i spowodowania trudności interpretacyjnych wynikających ze słabego poznania niektórych rodzajów materiału biologicznego, a także mnogości czynników wpływających na jego pośmiertne przemiany.

Niniejsza praca zawiera charakterystykę karbamazepiny wraz z przeglądem przypadków zatruć tym lekiem, a także jego przemian zachodzących za życia i po śmierci. Ponadto, scharakteryzowano trzy rodzaje alternatywnego materiału biologicznego: kości, szpik kostny i maź gnilną w kontekście pośmiertnych przemian tych materiałów.

1. KARBAMAZEPINA: OBSZAR ZASTOSOWAŃ, DAWKI TERAPEUTYCZNE I TOKSYCZNOŚĆ

Leki przeciwpadaczkowe są powszechnie stosowane w celu przeciwdziałania napadom padaczkowym poprzez hamowanie samorzutnej depolaryzacji błony komórkowej neuronów, powodującej wywołanie potencjału czynnościowego, prowadzącego do wystąpienia napadu drgawek epileptycznych. Farmakoterapia z zastosowaniem leków przeciwpadaczkowych jest zazwyczaj długotrwała, a jej powodzenie zależy od prawidłowego określenia postaci choroby oraz właściwie dobranej dawki leku bądź leków oraz ich wzajemnych interakcji w przypadku terapii wielolekowej [1].

Karbamazepina (CBZ) jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwpadaczkowych, należącym do grupy pochodnych dibenzoazepiny. Preparaty farmaceutyczne dostępne na rynku to m.in. *Tegretol*, *Amizepin*, *Conzepin*, *Timonil*,

Finlepsin, *Neurotop* i in. Dominującą drogą podawania jest doustne przyjmowanie tabletek lub syropów [2].

W terapii przeciwpadaczkowej karbamazepina stosowana jest przede wszystkim jako środek zapobiegający i łagodzący napady kloniczno-toniczne, a także napady częściowe z objawami prostymi i złożonymi. Nie jest to jednak wyłączone zastosowanie tego leku. Ze względu na działanie psychotropowe karbamazepiny, stosuje się ją w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej, zespołów maniakalnych i schizofrenii [2]. Występowanie podobieństw strukturalnych karbamazepiny i związków chemicznych z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych spowodowało powstanie przesłanek do przypuszczeń, że karbamazepina może wykazywać działanie przeciwdepresyjne. Badania potwierdziły w większym stopniu jej skuteczność w profilaktyce przeciwdepresyjnej niż w leczeniu ostrych zaburzeń depresyjnych [3].

Dawkowanie karbamazepiny zależy jest od czynników takich jak wiek pacjenta, typ leczonej choroby, a także wystąpienie poprawy klinicznej lub jej brak. Z tego też powodu zakres stosowanych dawek jest szeroki i wynosi od 200 do 1600 mg na dobę, natomiast średnia dobową dawką wynosi od 400 do 600 mg. Zaleca się, aby dawka terapeutyczna w każdym przypadku została dobrana na podstawie wyników monitorowania stężenia leku w surowicy [2]. Stężenie terapeutyczne karbamazepiny w surowicy wynosi zazwyczaj od 4 do 12 mg/L [4]. W Tabeli 1 zestawiono przykłady wyników badań nad korelacją między przyjętą dawką karbamazepiny, a jej stężeniem w surowicy, które odpowiada osiągnięciu stanu stacjonarnego leku w organizmie.

Tabela 1. Zależność między dawką a stężeniem karbamazepiny w osoczu
Table 1. Relationship between plasma concentration and dosage of carbamazepine

Liczba pacjentów	Zakres dawek	Zakres stężeń w surowicy [mg/L]	Średnie stężenie w surowicy [mg/L]	Lit.
248	2,86–37,5 [mg/kg/dzień]	0,6–19,6	5,3	[5]
24	8–30 [mg/kg/dzień]	3–13	8	[6]
22	300–800 (tabletki) 375–1000 (czopki) [mg/dzień]	4,8–7,8 4,5–7,4	6,3 5,9	[7]
21	300–1200 [mg/dzień]	4,5–14,1	9,3	[8]

Szerokie rozpowszechnienie karbamazepiny w lecznictwie wynika z relatywnie niewielkiej toksyczności tego leku, która spowodowała uznanie go za lek stosunkowo bezpieczny. Do częstej stosowalności tej substancji przyczynił się również brak potencjału uzależniającego, należy jednak wspomnieć o występowaniu zjawiska tolerancji wśród osób, u których konieczne jest ciągle zażywanie leku. Duża

dostępność karbamazepiny w połączeniu z niskim indeksem terapeutycznym są przyczynami występowania częstych zatruc tą substancją, jednak śmierć w wyniku zatrucia występuje rzadko [9].

W zależności od źródła, minimalna dawka karbamazepiny niebezpieczna dla życia szacowana jest od 5 g [4] do powyżej 6 g [10]. Ze względu na fakt, iż w niektórych przypadkach (zwłaszcza śmiertelnych) utrudnione jest przeprowadzenie wywiadu mającego na celu ustalenie dawki przyjętej przez ofiarę zatrucia, korzystniejsze jest posługiwanie się stężeniami karbamazepiny w surowicy. Przy stężeniu między 2,4 a 10,5 mg/L u badanych osób zarejestrowano wystąpienie efektów toksycznych, natomiast symptomy ostrego zatrucia obserwowano u osób, u których stężenie karbamazepiny w surowicy wykazywało wartości od 3,2 do 21 mg/L [4]. Obydwa przedziały stężeń częściowo się nakładają, ponieważ wystąpienie objawów zatrucia uzależnione jest od wielu czynników, m.in., drogi podania leku, czasu od jego zażycia czy osobniczego tempa metabolizmu. Może także dojść do opóźnienia wystąpienia objawów zatrucia spowodowanego zażyciem leku w postaci wolno uwalniającej się. Inną możliwością jest utrzymywanie się objawów mimo spadku stężenia karbamazepiny w organizmie, spowodowane farmakologiczną aktywnością jej głównego metabolitu, 10,11-epoksydu karbamazepiny [9].

W wielu przypadkach zatruc ze skutkiem śmiertelnym, karbamazepina jest zaledwie jednym z ksenobiotyków obecnych w materiale sekcyjnym. Ze względu na dosyć częste zażywanie karbamazepiny w celach samobójczych, w badanym materiale wykryć można także leki uspokajające i przeciwdepresyjne, narkotyki i alkohol etylowy. Przykładem może być 20 przypadków śmiertelnych zatruc związanych z karbamazepiną, przebadanych w Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1996–2001. Stężenia CBZ w materiale sekcyjnym wynosiły od 1,5 do 78,6 mg/L, jednak w 8 przypadkach karbamazepina nie była jedynym lekiem wykrytym w badany materiale [9]. Innym przykładem są oznaczenia CBZ i metabolitów: 10,11-epoksydu karbamazepiny oraz 10,11-dihydroksykarmamazepiny w materiale sekcyjnym, przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum w Krakowie. Materiał do badań pobrano od 16 osób, wśród których znajdowały się ofiary zatruc śmiertelnych ale także m. in. samobójstw, wypadków lub zabójstwa. W czterech przypadkach nastąpienie zgonu przypisano wysokiemu stężeniu CBZ w organizmie. W innych przypadkach zanotowano obecność CBZ na poziomach stężeń od terapeutycznych do śmiertelnych, a ponadto wysokie stężenia innych ksenobiotyków, m.in. etanolu, morfiny i benzodiazepin. Wyniki te wskazały na istotność uwzględnienia interakcji między ksenobiotykami w interpretacji przyczyn śmierci związanych z zatruciami [33].

W Tabeli zestawiono dane na temat opisywanych w literaturze przypadków, w których wystąpienie objawów ostrego zatrucia bądź śmierci uznano za spowodowane przedawkowaniem karbamazepiny.

Tabela 2. Przypadki zatruc karbamazepiną
Table 2. Reported cases of carbamazepine intoxications

Wiek i płeć pacjenta	Przyjęta dawka CBZ	Stężenie CBZ [mg/L]	Czas od przyjęcia lub zabiegów*	Materiał biologiczny	Inne obecne ksenobiotyki	Najpoważniejsze skutki zatrucia	Lit.
48 lat, M	brak danych	> 20,0	> 24 h	surowica	brak	niewydolność wielonarządowa, śpiączka	[12]
24 lata, K	56 g	36,9	6 h	surowica	oksaprozyna	ostra niewydolność nerek, tachykardia zatokowa	[13]
43 lata, M	400 mg/4 razy/dzień	16,1	-	surowica	brak	utrata słuchu	[14]
11 lat, M	2,6 g	brak danych	-	surowica	brak	śpiączka, delirium	[15]
19 lat, K	8,0 g	57,7	-	surowica	brak	depresja OUN	[16]
48 lat, M	60-80 g	25,6	płukanie żołądka, C	surowica	brak	niewydolność oddechowa	[17]
32 lata, K	32 g	32,9	2,5 h C	surowica	paracetamol 45 mg/L	drgawki, hipoksja, hipotensja	[18]
38 lat, K	8,0 g	> 400,0	-	surowica	brak	śpiączka	[19]
31 lat, K	60 g	46,3	4 dni, C, nawadnianie jelit	surowica	diazepam, nitrazepam, etanol	śpiączka, napady drgawkowe	[20]
23 miesiące	500 mg/dzień	22,0 34,8 78,5	oznaczono po śmierci	krew, mózg, wątroba	fenytoina	śmierć	[21]
14 lat, M	6,0 g	22,5	12 h płukanie żołądka, C	krew	brak	utrata świadomości, brak reakcji na bodźce dźwiękowe	[22]
13 lat, K	4,8 g	34,0	9 h płukanie żołądka, C	krew	brak	utrata świadomości	[22]
13 lat, K	5,6 g	20,0	-	krew	brak	utrata świadomości, napady toniczno-kloniczne	[22]
2 lata, M	10 mg/kg 6 miesięcy	6,0	-	surowica	brak	erytroblastopenia	[23]
15 lat, K	4,6 g	44,8	6 h	surowica	brak	utrata przytomności	[26]

* „czas od przyjęcia lub zabiegów” to dane określające przybliżony czas, jaki upłynął od przyjęcia CBZ do wykonania oznaczenia leku lub zabiegów jakie przeprowadzono w celu przyspieszenia eliminacji CBZ przez oznaczeniem (C = węgiel aktywny)

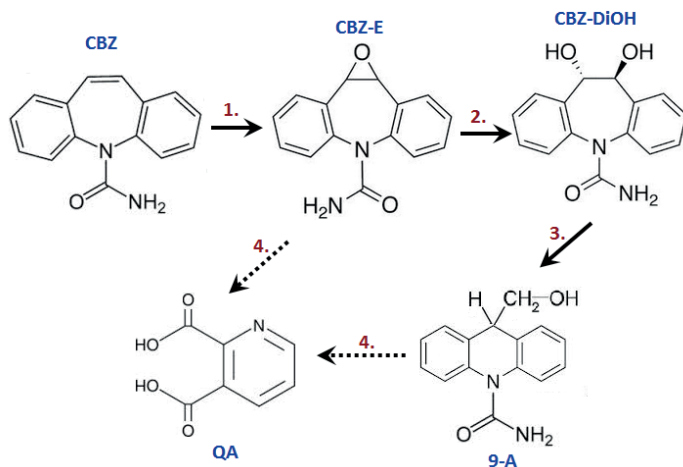
Sposoby leczenia zatruc karbamazepiną mogą różnić się w zależności od występujących objawów, jednak na ogół stosuje się usuwanie leku z żołądka za pomocą jego płukania lub podawania węgla aktywnego w krótkim czasie po rozpoznaniu zatrucia, a także wspomaganie czynności życiowych, których efektywność została zaburzona na skutek zatrucia. W przypadkach bardzo ostrych zatruc, gdy intensywne terapia podtrzymująca nie przynosi efektów, stosuje się pozaustrojową eliminację karbamazepiny technikami hemoperfuzji lub hemodializy [10].

1.1. ZAŻYCIOWE PRZEMIANY KARBAMAZEPINY W ORGANIZMIE

Przemiany karbamazepiny w organizmie żywym są dość dobrze zbadane. W literaturze można znaleźć informacje na temat głównych metabolitów oraz procesów odpowiedzialnych za ich powstawanie, a także enzymów biorących udział w tych procesach. Badania nad metabolizmem karbamazepiny są jednak nadal prowadzone, a ich potrzeba wynika z faktu, iż co jakiś czas notowane są budzące zainteresowanie lub nieznane dotychczas efekty toksyczne u pacjentów poddanych terapii farmakologicznej z zastosowaniem karbamazepiny [25]. Ważną rolę w procesach metabolicznych tej substancji przypisuje się także złożonym interakcjom lekowym, które mogą być skutkiem poddawania pacjenta terapii wielolekowej. Konsekwencją tych interakcji są często obserwowane toksyczne efekty interferencyjne, które mogą prowadzić do obniżenia lub podwyższenia stężenia leku w surowicy. W połączeniu z farmakologicznymi efektami wywoływanymi przez aktywne metabolity karbamazepiny, zjawiska takie przyczyniają się do dużego zróżnicowania procesów biotransformacji leku, a w konsekwencji do trudności w interpretacji wyników analiz sądowo-lekarskich [11].

Biodostępność karbamazepiny po podaniu doustnym wynosi powyżej 70% [4]. Od 75% do 80% związku ulega wiązaniu z białkami osocza, z których większość stanowią albuminy [10]. 72% przyjętej dawki wydalane jest wraz z moczem [2], z czego mniej niż 10% [4], a zwykle około 2% [10] stanowi niezmienną metabolicznie karbamazepina. Większość pozostałej części wydalana jest z kałem, jednak należy wspomnieć, że karbamazepina przenika także do mleka matki [10] oraz do śliny ze stosunkiem stężeń osocze:ślina na poziomie 3:5 [4].

Dane literaturowe pozwalają na zobrazowanie wybranych etapów metabolizmu karbamazepiny za pomocą schematu przedstawionego na Rysunku 1. Strzałkami ciągłymi zaznaczono dobrze poznane etapy przemian tego leku, natomiast strzałki przerywane odpowiadają procesom, których dokładne scharakteryzowanie wymaga dalszych badań.



Rysunek 1. Wybrane szlaki metaboliczne karbamazepiny. CBZ = karbamazepina; CBZ-E = 10,11-epoksyd karbamazepiny; CBZ-DiOH = *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroksykarmamazepina; 9-A = hydroksymetylo-10-karbamoiloakrydan; QA = kwas chinolinowy

Figure 1. Selected metabolic pathways of carbamazepine (CBZ = carbamazepine; CBZ-E = carbamazepine-10,11-epoxide; CBZ-DiOH = 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine; 9-A = 9-hydroxymethyl-10-carbamoylacridan; QA = quinolinic acid)

CBZ-E jest najważniejszym metabolitem karbamazepiny, ze względu na jego aktywność farmakologiczną, podobną do aktywności związku macierzystego (również wykazuje działanie przeciwdrgawkowe).[10] Metabolit w 50%-tach wiąże się z białkami osocza, natomiast 2% epoksydu wydalane jest z moczem.[4] W surowicy i mózgu CBZ-E osiąga 50% stężenia karbamazepiny.[1] Wykazano także stabilną korelację między stężeniem CBZ a CBZ-E w osoczu oraz w ślinie, gdzie stosunki stężeń wynosiły odpowiednio 21–22% i 33–34%. Co ważne, korelacja ta była dosyć odporna na niewielkie zmiany dawek, a także wiek i płeć pacjentów [8]. W związku z powyższym, oznaczanie 10,11-epoksydu karbamazepiny może dostarczyć informacji na temat stężeń związku macierzystego w organizmie, co jest szczególnie przydatne w przypadkach, gdy próbki do badań zostały pobrane po dłuższym czasie od zatrucia lub po śmierci.

CBZ-E ulega dalszemu metabolizmowi do *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroksykarmamazepiny (CBZ-Di-OH) w reakcji katalizowanej przez hydrolazę epoksydową (nr 2 na Rys. 1). Około 25% biodostępnej dawki karbamazepiny jest wydalane z moczem w postaci tego właśnie metabolitu [4]. CBZ-DiOH jest związkiem nie wykazującym działania farmakologicznego [3]. Notowane są przypadki, w których na skutek niedoboru hydrolazy epoksydowej, u pacjentów przyjmujących karbamazepinę i inne aromatyczne leki przeciwpadaczkowe, dochodzi do wystąpienia niebezpiecznego dla zdrowia i życia zespołu DRESS (ang. *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*) [24].

Przemiana CBZ-Di-OH do 9-hydroksymetylo-10-karbamoiloakrydanu karbamazepiny (9-A) odbywa się za sprawą enzymu mieloperoksydazy, obecnej w leuko-

cytach (nr 3 na Rys. 1). Powstający metabolit jest podejrzewany o aktywność biologiczną ze względu na podobieństwo strukturalne do innych aktywnych metabolitów [26]. Aktywność ta została potwierdzona tylko dla syntetycznego 9-A [47]. W alternatywnej ścieżce metabolicznej, 9-A może być produktem przemiany CBZ-E lub bezpośrednio CBZ.

Dwie alternatywne przemiany metaboliczne oznaczone numerem 4 na Rysunku 1 są przykładami przemian, które dotąd nie zostały dokładnie wyjaśnione. Ze względu na zdolność CBZ do przenikania przez barierę krew-mózg (choć w ograniczonym zakresie), obok metabolizmu przez enzymy wątrobowe, rozważano także możliwość metabolizowania związku macierzystego przez enzymy komórek śródbłonna ośrodkowego układu nerwowego. Ze względu na nieobecność CBZ w komórkach OUN, za prekursor QA uznano CBZ-E, a przemawiały za tym porównywalne wartości szybkości przemian CBZ-E oraz QA. Udział komórek OUN w metabolizmie jest o tyle ważny, że może doprowadzić do niekontrolowanej akumulacji metabolitów, w tym przypadku kwasu chinolinowego, który wykazuje neurotoksyczność i może wywoływać napady drgawek przy stężeniach wykrytych w komórkach mózgu badanych pacjentów (ok. 10 $\mu\text{mol/L}$) [25].

Opisane powyżej przemiany nie wyczerpują zagadnienia metabolizmu karbamazepiny, ponieważ związek ten jest źródłem łącznie około 30 metabolitów [10]. Należą do nich między innymi iminostilben, grupa produktów hydroksylacji pierścienia aromatycznego oraz izomery tych produktów, a także produkty sprzęgania z kwasem glukuronowym [3]. Źródłem zainteresowania w toksykologii klinicznej i sądowej są jednak głównie te metabolity, które wykazują aktywność farmakologiczną lub toksyczne właściwości, a ich stężenia pozwalają na wykonanie oznaczeń i wyciągnięcie wniosków na temat obecności i stężeń związku macierzystego w organizmie.

1.2. METABOLIZM POŚMIERTNY

Jak wiadomo, przemiany ksenobiotyków w organizmach nie ustają w momencie zgonu. Biochemiczne i biologiczne procesy, które zachodzą po śmierci mogą w znacznym stopniu wpływać na wyniki oznaczeń w materiale sekcyjnym, w związku z czym wyniki te niekoniecznie odzwierciedlają stężenia analitów w chwili śmierci [36].

Na wyniki analiz toksykologicznych wykonywanych na próbkach sekcyjnych, a także na wiarygodność tych wyników, mają wpływ między innymi: rodzaj analitu, inne ksenobiotyki obecne w organizmie, czas jaki upłynął od nastąpienia zgonu, przyczynę zgonu oraz losy organizmu bezpośrednio przed nim (np. treść żołądkowa) [27]. Duże znaczenie ma także temperatura i wilgotność otoczenia oraz inne warunki atmosferyczne, przy czym czynniki te inaczej wpływają na przemiany substancji chemicznych w zwłokach niepochowanych i pochowanych. W tym drugim przypadku do czynników wartych uwzględnienia należy także rodzaj pochówku, co

wiąże się z wpływem substancji zawartych w otaczającej ciało glebie [28]. Należy wreszcie wspomnieć o pośmiertnym metabolizmie mikrobiologicznym, przeprowadzonym przez mikroorganizmy obecne w ciele za życia (np. bakterie z przewodu pokarmowego, jamy ustnej czy płuc lub grzyby, których obecność jest skutkiem infekcji), a także inne bakterie i grzyby kolonizujące zwłoki po śmierci [27].

Ze względu na trudności występujące w badaniach, niektóre pośmiertne procesy prowadzące do przemian ksenobiotyków nie zostały dość dobrze poznane. Przykładem może być tzw. agonalna inwazja bakterii, podczas której mikroorganizmy gwałtownie rozprzestrzeniają się po organizmie w chwili bezpośrednio poprzedzającej nadejście zgonu. Proces ten określany jest jako teoretyczny ze względu na trudności w określeniu, czy obecność bakterii nie była spowodowana przedśmiertną infekcją [27]. Do dobrze poznanych zjawisk należy aktywność niektórych enzymów, przejawiająca się jeszcze przez jakiś czas po nastąpieniu zgonu. Skutkiem tej aktywności może być zwiększenie stężenia metabolitów kosztem stężenia ksenobiotyku macierzystego w porównaniu do stosunku stężeń w chwili śmierci. Powiązaniem procesem jest także uwalnianie enzymów podczas autolizy komórek, wskutek czego dochodzi do rozpadu białek wiążących ksenobiotyki i wzrost stężenia niezwiązanych frakcji analitu [27].

Pośmiertna redystrybucja ksenobiotyków (ang. *postmortem redistribution*, PMR) może zachodzić zgodnie z dwoma głównymi mechanizmami. Pierwszym z nich jest dyfuzja przez naczynia krwionośne do otaczających tkanek. Drugi mechanizm obejmuje bezpośrednią dyfuzję ksenobiotyków pomiędzy przylegającymi organami. Obydwa mechanizmy zachodzą w organizmie równolegle, przy czym czas, jaki upłynął od śmierci do wystąpienia danego zjawiska, zależy między innymi od rodzaju ksenobiotyku [36].

Powszechność występowania mikroorganizmów wspomagających tanatochemiczne procesy materiału biologicznego, powoduje pojawienie się pośmiertnych procesów gnilnych, wskutek których może dojść zarówno do biodegradacji ksenobiotyków, jak i ich syntezy. W pośmiertnie pobranych próbkach ludzkiego materiału biologicznego zidentyfikowano wiele gatunków bakterii, spośród których *Rhodococcus rhodochrous* jest przykładem gatunku zdolnego do metabolizowania karbamazepiny. W badaniach przeprowadzonych przez Gauthier i in. zaobserwowano, że biodegradacja CBZ z udziałem tych bakterii może prowadzić do obniżenia pierwotnego stężenia leku o 15% w ciągu 28 dni. Zastosowanie HPLC-MS pozwoliło na wykrycie dwóch stabilnych metabolitów, będących produktami tych przemian. Co ciekawe, metabolity powstałe w wyniku metabolizmu bakteryjnego nie były obecne w próbkach poddanych degradacji abiotycznej. Ze względu na trudność prowadzenia tego typu badań na próbkach rzeczywistych, powyższe dane pochodzą z modelowych badań laboratoryjnych. Można jednak przypuszczać, że w dogodnych warunkach *Rhodococcus rhodochrous* będzie zachowywał zdolność do obniżania stężeń karbamazepiny w próbkach sekcyjnych w zaawansowanym stadium procesów gnilnych [29].

Bakterie z rodzaju *Sterptomyces* zawdzięczają zdolność do metabolizowania karbamazepiny obecności układu enzymatycznego przeprowadzającego hydroksylację zależną od cytochromu P-450. Produktami tych przemian są CBZ-E oraz 10-11-dihydro-10-hydroksykarbamazepina. Aktywność hydroksylacji i epoksydacji CBZ przez wspomniane bakterie jest silnie zależna od warunków hodowli. Najbardziej aktywny gatunek (*Sterptomyces violascens*) w optymalnych warunkach miał zdolność do przeprowadzania hydroksylacji ze średnią szybkością 210 mg/L/dzień [30].

W literaturze można także znaleźć dane na temat mikrobiologicznego pośmiertnego metabolizmu karbamazepiny, dotyczącego przemian dokonywanych przez grzyby, które wykorzystują lek jako substrat do własnych procesów metabolicznych.

Kropidlak czarny (*Aspergillus niger*) to jeden z gatunków zdolnych do przeprowadzania biodegradacji karbamazepiny. Grzyb ten występuje w wilgotnych miejscach o ograniczonym dostępie światła, przeważnie w glebie. Procesy gnilne zachodzące po śmierci w organizmie stwarzają korzystne warunki do rozwoju tego gatunku. Może on jednak występować także w żywych organizmach, wywołuje wówczas infekcje spowodowane np. wdychaniem zarodników [31]. W badaniach Gauthier i in. zarejestrowano 9-procentowy spadek stężenia CBZ w ciągu 10 dni od umieszczenia mikroorganizmów na pożywce zawierającej lek. Już po 5 dniach następowały znaczące spadki stężenia analitu. Za obniżenie stężenia CBZ odpowiedzialne były dwa mechanizmy. Pierwszym z nich były przemiany metaboliczne grzyba, których skutkiem było zarejestrowanie sygnałów pochodzących od metabolitów. Drugi mechanizm, czyli adsorpcja leku na biomasie, odpowiedzialny był za spadek stężenia CBZ nie skutkujący pojawieniem się metabolitów [29].

Kolejnymi gatunkami grzybów o potwierdzonej zdolności do metabolizowania karbamazepiny są *Cunninghamella elegant* i *Umbelopsis ramanniana*. Gatunki te posiadają wiele enzymów fazy I i fazy II szlaków metabolicznych ssaków, dzięki czemu mogą być wykorzystywane jako organizmy modelowe do badania metabolizmu ksenobiotyków u ludzi. Dobrze znana jest zdolność do biotransformacji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) przez gatunek *Cunninghamella elegant*, który umożliwiony jest dzięki obecności enzymów z grupy cytochromów P450. Enzymy te biorą także udział w przemianach karbamazepiny, która wykazuje strukturalne podobieństwo do TLPD. W wyniku badań przeprowadzonych z zastosowaniem techniki HPLC-MS, w przypadku obu gatunków zidentyfikowano dwa główne metabolity: CBZ-E oraz 3-hydroksykarbamazepinę. 25-dniowa inkubacja gatunku *Cunninghamella elegant* skutkowała 43-procentowym spadkiem pierwotnego stężenia CBZ z wytworzeniem dwóch wymienionych wcześniej metabolitów, a także dodatkowo 2-hydroksykarbamazepiny. Biotransformacji przez gatunek *Umbelopsis ramanniana* uległo 23% pierwotnej ilości CBZ. W tym przypadku dodatkowym wykrytym metabolitem był niezidentyfikowany związek chemiczny, prawdopodobnie 1-hydroksykarbamazepina lub 4-hydroksykarbamazepina. Warto

dodać, że produkty metabolizmu grzybiczego zarejestrowano już po 1 dniu inkubacji [39].

Z powyższych danych wynika, że metabolity powstające w wyniku metabolizmu bakteryjnego lub grzybiczego wykazują zgodność z tymi, które są produktami przemian przeprowadzanych przez organizm ludzki. W związku z tym można się spodziewać, że w warunkach korzystnych dla rozwoju określonych mikroorganizmów (a warunki takie zapewnia ciało w stadium rozkładu gnilnego), ubytek stężenia leku macierzystego będzie znaczny. Opisane zjawiska powodują, że oznaczanie karbamazepiny i innych leków w próbkach materiału sekcyjnego jest dużym wyzwaniem analitycznych, ze względu na trudność we właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Interpretacja ta wymaga znajomości jak największej liczby czynników wpływających na przemiany zachodzące w organizmie po śmierci, a zdobycie tej wiedzy nie zawsze jest możliwe.

2. WYBRANE RODZAJE ALTERNATYWNYCH MATERIAŁÓW BIOLOGICZNYCH I ICH POŚMIERTNE PRZEMIANY

Wraz z postępującą degradacją zwłok, wzrasta ilość czynników, które należy uwzględnić w celu właściwego doboru działań analitycznych. Rozwiązanie napotkanych problemów często wymaga posiadania wiedzy z zakresu wielu dziedzin, m.in. chemii, biologii, biochemii, mikrobiologii, entomologii, medycyny sądowej i in. [33]. W analizach toksykologicznych przeprowadzanych w przypadkach podejrzenia o mechanizm śmierci z zatrucia, najczęściej pobieranymi materiałami są krew i moczu. W zależności od przyczyny śmierci, czasu jaki upłynął od nastąpienia zgonu i warunków, w których przebywało ciało, może się jednak okazać, że pobranie i analiza wspomnianych materiałów nie są możliwe. Wówczas korzystnym rozwiązaniem jest sięgnięcie po alternatywne materiały biologiczne, których mnogość dostarcza ludzkie ciało. Do materiałów tych można zaliczyć płyny ustrojowe (maż stawowa, płyn mózgowo rdzeniowy, żółć, płyn z gałki ocznej, płyn błędnikowy), wydzieliny (ślina, pot, łzy), twory naskórka (włosy, paznokcie), a także tkanki (kości, szpik kostny) [44]. Każdy z wymienionych materiałów posiada własny, specyficzny zestaw cech, decydujących o jego przydatności w analizach toksykologicznych. Kości są materiałem szczególnie przydatnym w analizach próbek sekcyjnych i ekshumowanych, ze względu na bardzo długi czas zachowania tego materiału i stosunkowo małą podatność na procesy biodegradacji. Szpik kostny i maż gnilna są z kolei materiałami rzadziej używanymi i przez to mniej poznanymi i scharakteryzowanymi, ale wykazującymi potencjał w zastosowaniu jako materiały do pośmiertnych analiz toksykologicznych.

2.1. KOŚCI

Kości nie są materiałem stosowanym w rutynowych analizach toksykologicznych. Stanowią jednak jedno z najważniejszych pośmiertnych źródeł DNA [31]. Liczba publikowanych badań dotyczących oznaczania leków w tkance kostnej stale rośnie, przy czym są to głównie badania na modelach zwierzęcych. Do ksenobiotyków oznaczonych jak dotąd w kościach należą: ketamina, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, benzodiazepiny, morfina, leki przeciwpsychotyczne i przeciwpadaczkowe. Prowadzone są także badania mające na celu lepsze poznanie mechanizmów wychwytu ksenobiotyków przez tkankę kostną, dystrybucji ksenobiotyków zależnej od rodzaju kości, a także stosunków stężeń związków macierzystych i metabolitów. Potrzeba szczegółowego scharakteryzowania powyższych aspektów dotyczących kości wynika z dużego potencjału tego materiału w dostarczaniu cennych i często jedynych informacji na temat ksenobiotyków obecnych w zdegradowanych szczątkach ludzkich. W przypadku zwłok podlegających zaawansowanym procesom gnilnym oraz szczątków ekshumowanych, kości są często jedynym materiałem nadającym się do analizy [34].

Watterson i in. przeprowadzili wiele badań z zakresu ilościowych analiz leków w kościach pochodzących od szczurów. Udowodniono, że głównym czynnikiem wpływającym na stężenie ksenobiotyków jest rodzaj kości oraz jej anatomiczne umiejscowienie. Największe znaczenie ma względna ilość istoty gąbczastej i istoty zbitiej, rodzaj obecnego szpiku kostnego, a także stopień unaczynienia kości. Zauważono także wpływ sąsiedztwa kości z jamami ciała (np. jamą klatki piersiowej) na zawartość ksenobiotyków w próbkach. Ma to znaczenie zwłaszcza w kontekście rozkładu gnilnego ciała, kiedy kości narażone są na kontakt z upłynnionymi tkankami, zawierającymi pewne ilości ksenobiotyków. W konsekwencji niektóre kości są materiałem bardziej przydatnym do analiz niż inne, a przydatność ta może być zależna m.in. od położenia ciała [46].

Duża odporność mechaniczna i trwałość kości jest ich przystosowaniem do pełnionych w organizmie funkcji. Cechy takie jak mała zawartość wody i enzymów mają korzystny wpływ na zachowanie kości po śmierci, ponieważ powodują mumifikację materiału, zamiast jego gnicia. Kość stanowi także naturalną barierę dla promieniowania słonecznego oraz mikroorganizmów przyspieszających procesy rozkładu [31].

Proces zeszkieleтовania prowadzi do całkowitego zniszczenia tkanek miękkich i ekspozycji suchych kości. W zależności od tego, czy zwłoki pozostawały na wolnym powietrzu lub też były pochowane, proces ten może trwać od 1,5 do ponad 10 lat. Znaczne przyspieszenie zeszkieleтовania zachodzi za sprawą działań zwierząt, które mogą doprowadzić do zniszczenia tkanek miękkich nawet w ciągu 40 dni [36].

Ogrom procesów chemicznych, biochemicznych i fizycznych zachodzących zarówno na wolnym powietrzu, jak i w grobie powoduje, że kości również podlegają procesom pośmiertnej degradacji, mimo większej odporności na te czynniki w porównaniu z innymi rodzajami materiału biologicznego. Ogół procesów prowa-

dzących do dezintegracji kości jako całości nazywany jest wietrzeniem kości i przebiega w 6 umownych etapach. Czas trwania każdego z etapów zależy od zaistniałych warunków i rodzaju kości. Wietrzenie kości obejmuje zarówno ich powierzchnię, jak części podpowierzchniowe. Proces ten zachodzi szybciej w przypadku kości niepochowanych. Następuje także proces kolonizacji kości przez grzyby, bakterie i zwierzęta oraz rośliny. Produkty przemiany materii tych organizmów powodują osłabienie i przebarwienia kości [37].

Pośmiertne przemiany kości mogą skutkować pojawieniem się na ich powierzchni przebarwień o bardzo różnorodnych odcieniach. Żółto-brązowe zabarwienie pochodzi zwykle od składników gleby. Ciemna czerwono-brązowa barwa to pozostałość po hemolizie, natomiast ciemna czerwono-szara barwa wskazuje na zabrudzenie powstałe na skutek kontaktu z płynami gnilnymi. Białe zabarwienie kości może być skutkiem wybielania pod wpływem promieniowania słonecznego. Odcienie zieleni, w tym kolor szaro-zielony i oliwkowy pochodzą od najczęściej występujących gatunków grzybów, czyli gatunków z rodzin *Aspergillus* i *Penicillium*. W zależności od innych obecnych mikroorganizmów, kości mogą przyjmować także inne barwy. Pojawienie się zabarwienia, jego intensywność i powierzchnia mogą różnić się zależnie od tego czy kości zostały pochowane, a następnie odsłonięte, czy też kolejność była odwrotna [38].

2.2. MAŻ GNILNA

W dostępnej literaturze trudno znaleźć jakiegokolwiek doniesienia na temat wykorzystania mazi gnilnej jako materiału do analiz toksykologicznych. Nie zostały również scharakteryzowane cechy fizykochemiczne tego materiału. Można zatem przypuszczać, że przydatność mazi gnilnej ogranicza się do specjalnych przypadków, w których nie ma możliwości pobrania materiału o lepiej znanych właściwościach.

Maż gnilna zaczyna tworzyć się podczas rozpadu gnilnego zwłok, kiedy upłynione tkanki osadzają się na porowatych powierzchniach kości. Podczas następującego później procesu zeszkielewania, w zależności od zaistniałych warunków, na suchych kościach może pozostać pewna ilość mazi [34].

Bliższe przyjrzenie się tej substancji pozwala dostrzec, że jest to materiał niejednorodny, którego skład zależy od warunków, w jakich się wytworzył, a także od miejsca, z którego został pobrany. W próbkach pobranych z powierzchni czaszki można zaobserwować obecność włosów, natomiast jeśli maż została pobrana z rozpadającej się powierzchni kości, mogą być w niej obecne ukruszone fragmenty tkanki kostnej. Barwa mazi gnilnej jest zmienna (od jasnobrązowej do czarnej), podobnie jak jej konsystencja (od kruchej do plastycznej). Na podstawie powyższych danych wynikających z obserwacji można zatem stwierdzić, że maż gnilna jako produkt rozpadu gnilnego zwłok jest materiałem o zmiennym składzie. W związku z tym można się

spodziewać, że wyniki analiz tego materiału będą wykazywały małą powtarzalność oraz mogą stwarzać trudności interpretacyjne.

2.3. SZPIK KOSTNY

Szpiik kostny jest silnie ukrwioną tkanką o dużej zawartości tłuszczów, dzięki czemu może magazynować ksenobiotyki wprowadzone do organizmu [40]. Otaczająca jamę szpikową kość stanowi naturalną fizyczną barierę zapobiegającą kontaminacji szpiku, a bariera ta może w pewnym stopniu kontynuować swoją rolę nawet podczas wystąpienia urazu kości. Szpiik kostny ulega procesom gnilnym zachodzącym po śmierci, jednak procesy te zostają opóźnione, mimo silnego ukrwienia tkanki [43]. Wszystkie wymienione cechy są bardzo korzystne z punktu widzenia zastosowania szpiku kostnego jako materiału do analiz toksykologicznych, jednak niewystarczająca znajomość wszystkich aspektów pośmiertnej analizy szpiku powoduje, że nie jest to materiał wykorzystywany rutynowo. Podobnie jak w toksykologii, także w medycynie sądowej badanie szpiku kostnego nie jest rutynową procedurą. Histopatologiczna analiza szpiku może dostarczać wielu cennych informacji na temat przyczyny i czasu zgonu oraz chorób występujących przed śmiercią [41, 42]. Pomoc w ustalaniu przyczyny śmierci może również stanowić badanie szpiku pod kątem obecności okrzemek, w przypadkach podejrzenia o utonięcie [39]. Najczęściej jednak szpiik kostny wykorzystywany jest w dziedzinie genetyki sądowej, gdzie jest cennym źródłem DNA i RNA ze względu na wspomniane wcześniej właściwości umożliwiające zachowanie materiału genetycznego w dobrym stanie, mimo postępującego rozkładu gnilnego reszty ciała [43].

Wnikliwe scharakteryzowanie szpiku kostnego jest niezbędne do przeprowadzenia wiarygodnych analiz toksykologicznych i jednoznacznej interpretacji ich wyników. W związku z tym prowadzone są badania mające na celu określenie wpływu takich czynników jak np. rodzaj szpiku i miejsce jego pobrania, a także określenie korelacji między stężeniami ksenobiotyków w szpiku i innych matrycach. Najważniejsza wydaje się jednak próba odpowiedzi na pytania czy stężenia ksenobiotyków w pośmiertnych próbkach szpiku odzwierciedlają stężenia we krwi przed śmiercią oraz czy procesy farmakokinetyczne zachodzące w tym materiale pozwalają na wiarygodne oznaczenie ksenobiotyków [40]. Jak dotąd w kręgach naukowych nie została ustalona standardowa procedura pobierania szpiku kostnego [41].

Szpiik kostny jest najlepiej chronioną tkanką w organizmie. Osłona w postaci kości stanowi barierę chroniącą przed następującą po śmierci degradującą działalnością grzybów, bakterii, zwierząt i roślin, a także przed kontaminacją związkami zawartymi w glebie oraz produktami przemian gnilnych tkanek miękkich [44]. W momencie rozpadu lub pęknięcia kości, szpiik zostaje jednak narażony na wszystkie te czynniki i może nie być przydatny jako materiał do analiz [45]. W przypadkach naruszenia integralności kości, np. na skutek urazu, powinna być rozpatrzona

także możliwość pośmiertnej redystrybucji ksenobiotyków do szpiku kostnego, zwłaszcza dyfuzja z treści żołądkowej [40].

Wraz z upływem czasu od nastąpienia zgonu, w szpiku kostnym mogą zachodzić zmiany morfologiczne i przebarwienia, zależne od zaistniałych warunków. Początkowo czerwona lub żółta substancja o konsystencji żelu może stopniowo ciemnieć i przejść w formę brązowej oleistej cieczy, wysuszyć się do postaci brązowego lub żółtego proszku lub też podlegać przeobrażeniu tłuszczowo-woskowemu [40].

Podobnie jak kości, szpik kostny jest niejednorodną matrycą, której skład tłuszczowy i komórkowy zależy od miejsca pobrania i cech osobniczych źródła próbki [44]. Akumulacja ksenobiotyków w szpiku może zachodzić w różnym stopniu w zależności od zawartości wody w materiale. Do wykorzystania szpiku kostnego w analizach toksykologicznych konieczne jest uwzględnienie tych i wielu innych czynników, a ze względu na ich mnogość interpretacja wyników może być trudna i korzystne może okazać się dysponowanie wynikami z analizy lepiej poznanych matryc biologicznych.

UWAGI KOŃCOWE

Analiza toksykologiczna materiału sekcyjnego jest dziedziną, w której standardowe metody analityczne i procedury przygotowywania próbek mogą okazać się zawodne. W związku z tym niejednokrotnie konieczne jest zastosowanie specjalnego podejścia. Z wielu możliwych rodzajów materiału do badań należy w odpowiedni sposób wyselekcjonować i pobrać taki, którego analiza zapewni wiarygodne wyniki oraz umożliwi ich jednoznaczną interpretację. Interpretację tą znacznie komplikuje mnogość procesów zachodzących po śmierci oraz zależność tych procesów od bardzo wielu czynników. Niezbędna jest znajomość zarówno żączyowych jak i pośmiertnych przemian oznaczanych substancji, a także materiałów, w których dokonuje się oznaczeń. Powoduje to konieczność zastosowania indywidualnego podejścia do każdej analizy w dążeniu do uwzględnienia jak największej liczby zachodzących procesów oraz odpowiedniego doboru materiału do badań.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Kostowski, P. Kubikowski, *Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej*, Wyd. 5, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
- [2] *Indeks leków medycyny praktycznej*, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 1999.
- [3] *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*, A.F. Schatzberg, I.C. Nemeroff (Red.), American Psychiatric Publishing, 2009
- [4] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Red.), Wyd. 3, Pharmaceutical Press, Londyn 2004.
- [5] D.A. Svinarov, C.E. Pippenger, *Ther Drug Monit*, 1996, **18**(6), 660.

- [6] J.J. MacKichan, E.M. Zola, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1984, **18(4)**, 487.
- [7] J. Arvidsson, H.L. Nilsson, P. Sandstedt, G. Steinwall, B. Tonnby, G. Fleisch, *J. Child Neurol.*, 1995, **12(2)**, 114.
- [8] P. Petit, R. Lonjon, M. Cociglio, A. Sluzewska, J.P. Blayac, B. Hue, R. Alric, R. Pouget, R., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, **41(6)**, 541.
- [9] K. Reguła, B. Szpiech, K. Galer, M. Wiergowski, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.*, 2002, **52(4)**, 357.
- [10] *Zarys toksykologii klinicznej*, J. Pach (Red.), Wyd. 1, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009.
- [11] R. Wachowiak, J. Tobolski, D. Klimaszyk, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.*, 2004, **4**, 223.
- [12] T.G. Li, Y. Yan, N.N. Wang, M. Zhao, *Am. J. Emerg. Med.*, 2011, **29(5)**, 518.
- [13] M. Ozsarac, M. Sever, S. Gokova, S. Ersel, M. Sezis, *Turk. J. Med. Sci.*, 2011, **31(3)**, 702.
- [14] I. Teudt, A. Meier-Cillien, T. Grundmann, *Laryngo. Rhino. Otol.*, 2012, **91(3)**, 187.
- [15] M. Ahmed, T. McCarthy, *J. Pediatr. Epilepsy.*, 2012, **1(1)**, 65.
- [16] S. Yaylaci, M.V. Demir, B. Acar, S. Sipahi, A. Tamer, *Indian J. Pharmacol.*, 2012, **44(3)**, 417.
- [17] M. Ram Prabahaar, K. Raja Karthik, M. Singh, R.B. Singh, S. Singh, J. Dhamodharan, *Hemodial. Int.*, 2011, **15(3)**, 407.
- [18] J.L. Harder, M. Heung, A.M. Vilay, B.A. Mueller, J.H. Segal, *Hemodial. Int.*, 2011, **15(3)**, 412.
- [19] B. Saygan-Karamursel, S. Guven, L. Onderoglu, O. Deren, T. Durukan, *J. Perinat. Med.*, 2005, **33(1)**, 72.
- [20] A. Graudins, G. Peden, R.P. Drowsett, Massive overdose with controlled-release carbamazepine resulting in delayed peak serum concentrations and life-threatening toxicity, 2002, **14(1)**, 89.
- [21] V. V. Venci, M.M. Rowcliffe, M.M., L. Wollenberg, M.M. Rainka, F.M. Gengo, *Forensic. Sci. Med. Pathol.*, 2013, **9**, 73.
- [22] K. Bek, S. Kocak, O. Ozkaya, Y. Yilmaz, O.F. Aydin, C.S. Tasdoven, Carbamazepine poisoning managed with hemodialysis and hemoperfusion in three adolescents, 2007, **12**, 33.
- [23] H. Ozkaya, G. Aydemir, A.B. Akcan, M. Kul, F. Karademir, S. Aydmoz, S. Suleymanoglu, *Turk. J. Haematol.*, 2012, **29(2)**, 195.
- [24] P. Teng, B. Tan, *Dermatol. Online J.*, 2013, **19(5)**, 18170.
- [25] C. Ghosh, N. Marchi, M. Hossain, P. Rasmussen, A.V. Alexopoulos, J. Gonzalez-Martinez, H. Yang, D. Janigro, *Neurobol. Dis.*, 2012, **46**, 692.
- [26] A. Duzova, E. Baskin, Y. Usta, S. Ozen, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2001, **20(4)**, 175.
- [27] D.M. Butzbach, *Forensic. Sci. Med. Pathol.*, 2010, **6**, 35.
- [28] M. Dalpe-Scott, M. Degouffe, D. Garbutt, M. Drost, *Can. Soc. Forensic. Sci. J.*, 1995, **28(2)**, 113.
- [29] H. Gauthier, V. Yargeau, D.G. Cooper, *Sci. Total. Environ.*, 2010, **408**, 1701.
- [30] S.I. Kang, S.Y. Kang, H.G. Hur, *Appl. Microbiol. Biot.*, 2008, **79**, 663.
- [31] A.A. Martinez-Ramirez, J. Strien, J. Sanft, G. Mall, G. Walther, F.T. Peters, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 8443.
- [32] M. Kittelmann, R. Lattmann, O. Ghisalba, *Biosci. Biotech. and Bioch.*, 1993, **57(9)**, 1589.
- [33] G. Skopp, *Forensic. Sci. Int.*, 2004, **142**, 75.
- [34] *Encyclopedia of Forensic Sciences*, J.A. Siegel, P.J. Saukko (Red.), Academic Press, 2013.
- [35] N. Desrosiers, C.C. Betit, J.H. Watterson, *Forensic. Sci. Int.*, 2009, **188**, 23.
- [36] S. Raszeja, W. Nasiłowski, J. Markiewicz, *Medycyna sądowa. Podręcznik dla studentów*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1993.
- [37] A.K. Behrensmeyer, *Paleobiology*, 1978, **4(2)**, 150.
- [38] M.A. Huculak, T.L. Rogers, *J. Forensic. Sci.*, 2009, **54(5)**, 979.
- [39] T. Delabarde, Ch. Keyser, A. Tracqui, D. Charabidze, *Forensic. Sci. Int.*, 2013, **228**, e1.
- [40] N. Cartiser, F. Bevalot, L. Fanton, Y. Gaillard, J. Guitton, *Int. J. Legal. Med.*, 2011, **125**, 181.

- [41] L. Tattoli, M. Tsokos, J. Sautter, J. Anagnostopoulos, E. Maselli, G. Ingravallo, M. Delia, B. Solarino, *Forensic. Sci. Int.*, 2014, **234**, 72.
- [42] P. Roll, A. Beham, Ch. Beham-Shmid, *Forensic. Sci. Int.*, 2009, **186**, e17.
- [43] N.L. van Doorn, A.S. Wilson, E. Willerslev, T.P. Gilbert, *J. Forensic. Sci.*, 2011, **56(3)**, 720.
- [44] L.M. McIntyre, C.V. King, M. Boratto, O.H. Drummer, *Ther Drug Monit*, 2000, **22(1)**, 79.
- [45] N.M. Lafreniere, J.H. Watterson, *Forensic. Sci. Int.*, 2010, **194**, 60.
- [46] J.H. Watterson, H.M. Cornthwaite, *J. Anal. Toxicol.*, 2013, 565.
- [47] N. Wad, C. Guenat, G. Kramer, *Ther Drug Monit*, 1997, **19(3)**, 314.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lipca 2015

