



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ
ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ Η
ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΝΕΚΡΟΤΟΜΙΚΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ**

**Εξαδακτύλου Παρασκευή
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΤΟΥ Κ. _____

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: κ. Μπούμπα Βασιλική

Θέμα: «ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΤΟΥΣ ΣΕ ΝΕΚΡΟΤΟΜΙΚΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....^Α/...-...-.....

1 Μπούμπα Βασιλική

2 Κουρκουμέλης Νικόλαος

3 Φριλίγγος Ευστάθιος

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

22/02/2022

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Καθηγητής _____

Ο/Η Γραμματέας

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Δι-ιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) με τίτλο «Ανόργανη Βιολογική Χημεία». Το εν λόγω πρόγραμμα λειτουργεί στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων με τη συνεργασία των τμημάτων Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, του Πανεπιστημίου Πατρών, του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Πανεπιστημίου Κύπρου. Βασικός σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση των βιοδεικτών κατανάλωσης αιθανόλης σε νεκροτομικό βιολογικό υλικό. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε τόσο βιβλιογραφική ανασκόπηση των βιοδεικτών κατανάλωσης αιθανόλης, όσο και καταγραφή, ανάλυση και αξιολόγηση περιστατικών του εργαστηρίου, σε διάστημα 20 ετών.

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια της διπλωματικής ήταν η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, κ. Βασιλική Μπούμπα. Ευχαριστώ θερμά την κ. Μπούμπα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστούμε και να γνωρίσω ένα καινούργιο και συναρπαστικό χώρο – αυτόν της Δικαστικής Τοξικολογίας. Η καθοδήγηση και η υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου πορείας ήταν σημαντικές, ενώ ο δυναμισμός και η αποφασιστικότητά της, αποτέλεσαν για μένα πηγή έμπνευσης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου, γιατί μαζί τους, οι εργαστηριακές ημέρες, γίνονταν απολαυστικές. Ευχαριστώ τις Ιατροδικαστρίες του εργαστηρίου για την παροχή των βιολογικών υλικών, τις συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια κ. Αντιγόνη Μητσέλου, για τις συζητήσεις μας, επί παντός επιστητού, και κυρίως επειδή μου έμαθε να μη σταματώ να ψάχνω, μέχρι να βρω την αλήθεια.

Ευχαριστώ πολύ την Ιωάννα, για τις όμορφες ιδέες της, και τις βόλτες που γλυκαίνουν την ψυχή. Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω τον Ορέστη, το Βαγγέλη, τη Χριστίνα, τη Στέλλα. Τη Μαριαλένα και τη Λουίζα.

Τέλος, χωρίς την οικογένειά μου, δε θα ήμουν ο άνθρωπος που είμαι σήμερα. Στους γονείς μου, Θανάση και Κυριακή, και την αδερφή μου, Δήμητρα, οφείλω το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» και την ευγνωμοσύνη μου.

Παρασκευή (Εύη) Εξαδακτύλου

Too fast for freedom

Florence Welch

Περίληψη

Η αιθανόλη είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη νόμιμα, εξαρτησιογόνος ουσία, αφού αποτελεί βασικό συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών. Ακόμη, είναι δυνατόν, να παραχθεί μεταθανάτια από τη δράση των μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη, μέσω αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης είναι δυνατόν να παραχθεί στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία. Ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης -είτε κατάποση "εν ζωή" ή μεταθανάτια παραγωγή- και η εκτίμηση της συγκέντρωσής της στο αίμα την στιγμή του θανάτου αποτελεί πρόβλημα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία δεδομένου ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης που μετράται εργαστηριακά στα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα κλπ) χρησιμοποιείται σαν αποδεικτικό στοιχείο σε ποινικά και αστικά δικαστήρια.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται καταγραφή και αξιολόγηση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης, και των λοιπών πτητικών ενώσεων που τη συνοδεύουν, τόσο σε δείγματα κλινικών περιστατικών, όσο και σε δείγματα από νεκροτομές. Σκοπός είναι η εύρεση βιοδεικτών προθανάτιας κατανάλωσης αιθανόλης, σε μεταθανάτιο αίμα. Ακόμη, πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση των βιοδεικτών, του μη οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης, και της εφαρμογής τους σε νεκροτομικό υλικό. Τέλος, πραγματοποιείται σύγκριση των δυο κατηγοριών βιοδεικτών.

Abstract

Ethanol is the most widely used legally addictive substance, as it is a key ingredient in alcoholic beverages. It is introduced into the human body after consuming alcoholic beverages. It is also possible to produce it post-mortem by the action of microorganisms that are active during sepsis, through alcoholic fermentation. It can also be produced in posthumous biological materials after sampling. Clarifying the origin of ethanol - either swallowing "alive" or post-mortem production - and estimating its concentration in the blood at the time of death is a matter of paramount importance in Forensic Toxicology as the concentration of ethanol measured in laboratory blood in biological materials (blood, urine, etc.) is used as evidence in criminal and civil courts.

In the present dissertation, the concentrations of ethanol, and the other volatile compounds that accompany it, are recorded, and evaluated, both in clinical case samples and in autopsy specimens. The aim is to find biomarkers of ante-mortem ethanol consumption in post-mortem blood. In addition, a literature review of biomarkers, non-oxidative metabolism of ethanol, and their application in necropsy material is performed. Finally, a comparison of the two categories of biomarkers is made.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	iii
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	viii
Κατάλογος Πινάκων.....	xii
Κατάλογος Εικόνων.....	xiii
Κατάλογος Σχημάτων.....	xiv
Αρτικόλεξα - Abbreviations.....	xv
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή.....	1
1.1 Οι Επιπτώσεις της Χρήσης και Κατάχρησης Αιθανόλης στην Υγεία του Ανθρώπου.....	2
1.2 Η Αιθανόλη στον Οργανισμό.....	9
1.3 Η Φαρμακοκινητική της Αιθανόλης.....	10
1.3.1 Μη-οξειδωτικός Μεταβολισμός της Αιθανόλης.....	16
1.3.2 Φαρμακολογικές Επιδράσεις της Αιθανόλης.....	17
1.4 Ενδογενής Αλκοολογένεση.....	20
1.5 Μεταθανάτια Παραγωγή Αιθανόλης.....	21
1.6 Μικροβιακές Ζυμώσεις της Αιθανόλης.....	24
1.6.1 Αλκοολική ζύμωση από μύκητες και βακτήρια.....	26
1.6.2 Γαλακτική ζύμωση.....	28
1.6.2 Ζύμωση της 1-βουτανοδιόλης και του Μίγματος Οξέων.....	29
1.6.3 Ζυμώσεις των Αμινοξέων.....	31
1.7 Μέθοδοι Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού της Αιθανόλης.....	32
1.7.1 Αλκοτέστ.....	33
1.7.2 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας.....	36
1.7.3 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας.....	38
1.7.4 Αέρια Χρωματογραφία Υπερκείμενου Χώρου – Ανίχνευτής Ιονισμού Φλόγας.....	40
Επιλογή Κατάλληλου Εσωτερικού Προτύπου.....	43
1.7.5 Διαδερμική Ανίχνευση της Αιθανόλης.....	47
1.7.6 Ανίχνευση Αιθανόλης στα Ούρα.....	47
1.7.7 Ανίχνευση Αιθανόλης στη Σίελο.....	48
1.8 Νεκροτομικό Βιολογικό Υλικό.....	49
1.9 Βιοδείκτες Κατανάλωσης Αιθανόλης.....	52
1.9.1 Φωσφατιδνλοαιθανόλη.....	54
1.9.2 Αιθυλεστέρες των Λιπαρών Οξέων.....	57
1.9.3 5-Υδροξυ-τροπτοφώλη (5-HTOL).....	59
1.9.4 Αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG) και Θεϊικός Αιθυλεστέρας (EtS).....	61

1.9.5	<i>N</i> -ακετυλοταυρίνη.....	72
1.9.6	Αλκοόλες Ανώτερου Μοριακού Βάρους και άλλες Πτητικές Ενώσεις	73
1.10	Σκοπός Μελέτης.....	79
2	Μέθοδοι και Υλικά	80
2.1	Μέθοδοι.....	80
2.2	Διαλύματα.....	81
2.3	Νεκροτομικό Υλικό.....	82
2.4	Υλικό από Κλινικά Περιστατικά	82
2.5	Ανάλυση Πτητικών Ενώσεων με Αέρια Χρωματογραφία.....	83
2.6	Ποιοτική Ανίχνευση Πτητικών Ενώσεων.....	83
2.7	Ποσοτική Ανάλυση Αιθανόλης.....	84
2.8	Ποσοτική Ανάλυση 1-προπανόλης και 2-προπανόλης.....	85
2.9	Ποσοτική Ανάλυση Μεθανόλης και Οξικού Αιθυλεστέρα.....	86
2.10	Ποσοτική Ανάλυση 1-βουτανόλης και Ισοβουτανόλης.....	87
2.11	Ποσοτική Ανάλυση 3-μεθυλο-βουτανόλης και 2-μεθυλο-βουτανόλης.....	88
2.12	Ποσοτική Ανάλυση Ακετόνης και Ακεταλδεϋδης.....	89
2.13	Στατιστική Επεξεργασία	90
3.	Αποτελέσματα.....	91
3.1	Ανάλυση των Πτητικών Ενώσεων με Αέρια Χρωματογραφία (GC)	91
3.2	Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων στα Βιολογικά Υλικά	92
3.2.1	Προσδιορισμός των επιπέδων αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων, σε κλινικά δείγματα	92
3.2.2	Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της ακεταλδεϋδης.....	98
3.2.3	Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της ακετόνης.....	99
3.2.4	Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της 1-προπανόλης.....	100
3.2.5	Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της 2-προπανόλης.....	101
3.2.6	Προσδιορισμός πτητικών ενώσεων σε άλλα βιολογικά υλικά	102
3.3	Προσδιορισμός των επιπέδων αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων, σε νεκροτομικά δείγματα	102
3.3.1	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 1-προπανόλης.....	115
3.3.2	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 2-προπανόλης.....	117
3.3.3	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Μεθανόλης.....	118
3.3.4	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Οξικού Αιθυλεστέρα.....	119
3.3.5	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ισοβουτανόλης.....	120
3.3.6	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 1-βουτανόλης.....	121
3.3.7	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 3-μεθυλο-βουτανόλης.....	122

3.3.8	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 2-μεθυλο-βουτανόλης	123
3.3.9	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ακετόνης.....	124
3.3.10	Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ακεταλδεΐδης	125
3.3.11	Μελέτη Επίδρασης του Τρόπου Θανάτου στη Συγκέντρωση των Πτητικών Ενώσεων στο Αίμα	127
3.3.12	Μελέτη Επίδρασης του Βαθμού Σήψης στη Συγκέντρωση Πτητικών Ενώσεων στο Νεκροτομικό Αίμα	131
3.3.13	Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων σε άλλα Νεκροτομικά Βιολογικά Υλικά	134
	Συζήτηση	135
	Συμπεράσματα.....	144
	Βιβλιογραφία	146

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Ποσότητα ποτού ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση αιθανόλης 0,8 g/L αίματος	3
Πίνακας 2. Σύγκριση της συμπτωματολογίας και της κλινικής εικόνας με τα επίπεδα αιθανόλης στο αίμα. (Μιχαλοδημητράκης, 2001).....	19
Πίνακας 3. Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν αιθανόλη μεταθανάτια.....	22
Πίνακας 4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα διαφορετικών εσωτερικών προτύπων, για τη χρήση τους στην ανάλυση πτητικών με HS-GC-FID.....	45
Πίνακας 5. Επίπεδα πτητικών ενώσεων στο αίμα.....	46
Πίνακας 6. Αναλογία αιθανόλης σε διάφορα νεκροτομικά βιολογικά υλικά	52
Πίνακας 7. Ποιοτική Ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε αίμα από ζώντες.....	93
Πίνακας 8. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	94
Πίνακας 9. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης.....	95
Πίνακας 10. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακετόνης.....	96
Πίνακας 11. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης.....	97
Πίνακας 12. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-προπανόλης.....	98
Πίνακας 13. Ποιοτική Ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε νεκροτομικό αίμα	104
Πίνακας 14. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	105
Πίνακας 15. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης, σε νεκροτομικό αίμα.....	106
Πίνακας 16. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-προπανόλης, σε νεκροτομικό αίμα.....	107
Πίνακας 17. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις μεθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	108
Πίνακας 18. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, σε νεκροτομικό αίμα	109
Πίνακας 19. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	110
Πίνακας 20. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	111
Πίνακας 21. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 3-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	112
Πίνακας 22. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα	113
Πίνακας 23. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακετόνης, σε νεκροτομικό αίμα	114
Πίνακας 24. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, σε νεκροτομικό αίμα	115
Πίνακας 25. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση τον τρόπο θανάτου : Sudden (αιφνίδιος) - Unspecified (Αδιευκρίνιστος) - Violent (Βίαιος)	128
Πίνακας 26. Επίδραση του τρόπου θανάτου στη συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων στο αίμα	130
Πίνακας 27. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση το βαθμό σήψης : Χωρίς Σήψη - Αρχόμενη Σήψη - Προχωρημένη Σήψη	132
Πίνακας 28. Ταξινόμηση των περιστατικών βάσει του βαθμού σήψης τους. Στον πίνακα αναγράφονται και τα στατιστικά στοιχεία των πτητικών ενώσεων που εντοπίστηκαν στα περιστατικά αυτά	133

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Συνταντικός τύπος της αιθανόλης ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), σε τρεις διαστάσεις	2
Εικόνα 2. Ψηφιακή συσκευή αλκοτέστ	35
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση τριχοειδούς αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC/MS) (Skoog et al., 2007).....	38
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση υγρού χρωματογράφου με φασματόμετρο μάζας.(Östman, 2018)	40
Εικόνα 5. Διάγραμμα Αέριου Χρωματογράφου (Skoog et al., 2007).....	42
Εικόνα 6. Ο Αέριος Χρωματογράφος, με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας και το Headspace, του εργαστηρίου μας	42
Εικόνα 7. Ταινίες ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της αιθανόλης στη σίελο (JANT_Pharmacal_Corporation, n.d.).....	49

Κατάλογος Σχημάτων

<i>Σχήμα 1. Καταγεγραμμένη κατά κεφαλήν κατανάλωση αλκοόλ (15+) (σε λίτρα καθαρού οινοπνεύματος) ανά είδος αλκοολούχου ποτού, 2016.....</i>	<i>4</i>
<i>Σχήμα 2. Καταγεγραμμένη κατά κεφαλήν κατανάλωση οινοπνεύματος (15+), 1961–2016.....</i>	<i>4</i>
<i>Σχήμα 3. Επιπολασμός του συνδρόμου του εμβρυϊκού αλκοολούχου συνδρόμου και των διαταραχών του φάσματος του εμβρυϊκού αλκοόλ στον γενικό πληθυσμό, ανά περιοχή του ΠΟΥ.....</i>	<i>6</i>
<i>Σχήμα 4. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη Συγκέντρωση Αιθανόλης στο Αίμα (A. W. Jones, 2003).....</i>	<i>14</i>
<i>Σχήμα 5. Ο Οξειδωτικός Μεταβολισμός της Αιθανόλης (A. W. Jones, 2003).....</i>	<i>14</i>
<i>Σχήμα 6. Αλκοολική ζύμωση από μύκητες (A) και βακτήρια (B) (V. A. Boumba et al., 2008).....</i>	<i>27</i>
<i>Σχήμα 7. Γαλακτική ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (V. A. Boumba et al., 2008).....</i>	<i>29</i>
<i>Σχήμα 8. Ζύμωση προς μίγμα οξέων και 2,3-βιτανοδιόλης, που πραγματοποιείται από τα εντεροβακτήρια (V. A. Boumba et al., 2008).....</i>	<i>30</i>
<i>Σχήμα 9. Σχηματισμός της φωσφατιδυλαιθανόλης από τη φωσφατιδυλοχολίνη, με τη δράση της φωσφολιπάσης D (Sonmez et al., 2017).....</i>	<i>55</i>
<i>Σχήμα 10. Σχηματισμός των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από την αντίδραση των τριγλυκεριδίων με την αιθανόλη.(da et al., 2012).....</i>	<i>58</i>
<i>Σχήμα 11. Μετατροπή της σεροτονίνης σε 5-υδροξυ-τροπτοφόλη και 5-υδροξυϊνδολ-3-οξικό οξύ.....</i>	<i>60</i>
<i>Σχήμα 12. Χημικές αντιδράσεις των μετατροπών της αιθανόλης σε αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG) και θειικό αιθυλεστέρα (EtS)(Song et al., 2015).....</i>	<i>62</i>
<i>Σχήμα 13. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-150,0 mg/dL ($R^2 = 0,999974$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>85</i>
<i>Σχήμα 14. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,998327$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>85</i>
<i>Σχήμα 15. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 2-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999227$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>86</i>
<i>Σχήμα 16. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,999728$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>86</i>
<i>Σχήμα 17. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης του οξικού αιθυλεστέρα με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,997615$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>87</i>
<i>Σχήμα 18. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 1-βουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999243$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>87</i>
<i>Σχήμα 19. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ισοβουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999777$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>88</i>
<i>Σχήμα 20. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 3-μεθυλο-βουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999146$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>88</i>
<i>Σχήμα 21. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακετόνης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-20,0 mg/dL ($R^2 = 0,999312$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>89</i>
<i>Σχήμα 22. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακετόνης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-1,0 mg/dL ($R^2 = 0,999878$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>89</i>
<i>Σχήμα 23. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,999525$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.....</i>	<i>90</i>
<i>Σχήμα 24. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακεταλδεΐδης, σε κλινικά δείγματα αίματος.....</i>	<i>99</i>
<i>Σχήμα 25. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακετόνης, σε κλινικά δείγματα αίματος.....</i>	<i>100</i>
<i>Σχήμα 26. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 1-προπανόλης, σε κλινικά δείγματα αίματος.....</i>	<i>101</i>
<i>Σχήμα 27. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-προπανόλης, σε κλινικά δείγματα αίματος.....</i>	<i>102</i>
<i>Σχήμα 28. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης και 1-προπανόλης σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>116</i>
<i>Σχήμα 29. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-προπανόλης σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>118</i>
<i>Σχήμα 30. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα μεθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>119</i>
<i>Σχήμα 31. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα.....</i>	<i>120</i>
<i>Σχήμα 32. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα, σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>121</i>
<i>Σχήμα 33. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 1-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>122</i>
<i>Σχήμα 34. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 3-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>123</i>
<i>Σχήμα 35. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-μεθυλο-βουτανόλης.....</i>	<i>124</i>
<i>Σχήμα 36. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακετόνης, σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>125</i>
<i>Σχήμα 37. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακεταλδεΐδης σε νεκροτομικό αίμα.....</i>	<i>126</i>
<i>Σχήμα 38. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση τον τρόπο θανάτου (σε πίτα).....</i>	<i>129</i>
<i>Σχήμα 39. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση το βαθμό σήψης (πίτα).....</i>	<i>132</i>

Αρτικόλεξα - Abbreviations

GISAH	Global Information System on Alcohol and Health
5-HIAA	5-υδροξυ-ινδολο-3-οξικό οξύ
5-HTOL	5-υδροξυ-τρυπτοφόλη
AAFS	American Academy of Forensic Sciences
ABS	Auto-Brewery Syndrome
ACA	Alcohol Congeners Analysis
ADH	Alcohol Dehydrogenase
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ATP	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
AUDs	Alcohol Use Disorders
BAC	Blood Alcohol Concentration
BrAC	Breath Alcohol Concentration
CDT	τρανσφερίνη με έλλειψη υδατανθράκων
DBS	Dried Blood Spots
DDW	Double Distilled Water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ED	Entner–Doudoroff (γλυκολυτική οδός)
EI	electron Ionization
EMP	Embden–Meyerhof–Parnas (γλυκολυτική οδός)
EtG	Αιθυλογλυκουρονίδιο
EtOH	Ethanol
EtS	Θειικός Αιθυλεστέρας
eV	electron volt
FAEEs	Fatty Acids Ethyl Esters
FASD	Fetal Alcohol Spectrum Disorder
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HS-GC-FID	Headspace Gas Chromatography/ Flame Ionisation Detector
LAB	Lactic Acid Bacteria
LC-MS/MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LDH	Lactate Dehydrogenase
LLE	εκχύλιση υγρού-υγρού
LLOQ	Lower Limit of Quantitation
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Qualification
MCV	Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων
MS	Mass Spectrometry
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
PEth	phosphatidylethanol
PPT	κατακρήμνηση πρωτεϊνών
SOFT	Εταιρεία Εγκληματολογικών Τοξικολόγων

SPE	εκχύλιση στερεάς φάσης
STI	Sexually Transmitted Infections
UAC	Urinary Alcohol Concentration
UDP- γλυκουρονυλοτρανσφεράση	ουριδινο-5'-διφωσφο-γλυκουρονοσυλτρανσφεράση
ULOQ	Upper Limit of Quantitation
UPLC	Ultra High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
VH	Vitreous Humor
VHAC	Vitreous Humor Alcohol Concentration
ακέτυλο-CoA	ακέτυλο-συνένζυμο A
γGT	γ-γλουταμυλική τρανσφεράση
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
NAT	N-ακετυλοταυρίνη
ΣΜΝ	Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα

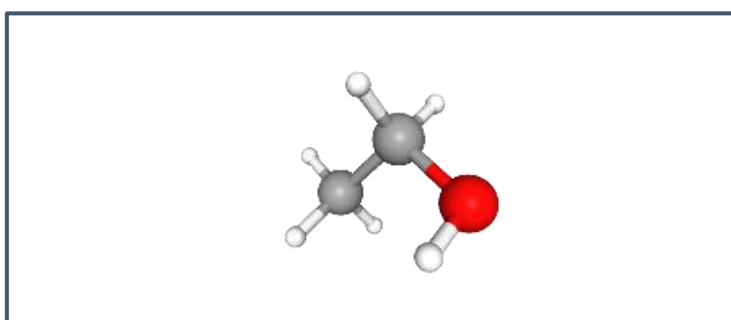
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

Η αιθανόλη (κοινώς γνωστή ως «οινόπνευμα» ή απλώς «αλκοόλ») είναι το παλαιότερο, και εξακολουθεί να είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη νόμιμα, εξαρτησιογόνος ουσία. Η παρασκευή κρασιών και μύρας έχει αναφερθεί από αρκετές εκατοντάδες πρώιμες κοινωνίες. Η σημασία αυτών των αλκοολούχων ποτών είναι εμφανής στην πολλαπλότητα των εθίμων και των κανονισμών που αναπτύχθηκαν γύρω από την παραγωγή και τις χρήσεις τους. Συχνά έγιναν κεντρικοί άξονες στις πιο πολύτιμες προσωπικές και κοινωνικές τελετές, ιδιαίτερα σε τελετές μετάβασης, και ήταν πανταχού παρόντες σε δραστηριότητες όπως γεννήσεις, μνήσεις, γάμοι, εορτές, κονκλάβια, μαγικές τελετές, ιατρική, λατρευτικές εκδηλώσεις, φιλοξενία, πόλεμοι, ή σύναψη ειρήνης και κηδείες (Vaillant & Keller, 2007)

Η ακριβής ημερομηνία της πρώτης χρήσης της αιθανόλης ως ποτό δεν είναι γνωστή, αλλά πιστεύεται ότι έγινε ήδη από το 10.000 π.Χ. Οι αρχαιολόγοι βρήκαν στοιχεία ότι το κριθάρι χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή μύρας για αιώνες. Οι Αιγύπτιοι έφτιαχναν μύρα από καλαμπόκι, ενώ στην Κίνα ένα αλκοολούχο ποτό εν ονόματι «samshu» εμφανίστηκε γύρω στο 7000 π.Χ., μαζί με το «σάκε» στην Ιαπωνία που παρασκευάζεται από ρύζι. Το κρασί και η μύρα έγιναν τα καθημερινά εναλλακτικά μέσα που σβήνουν τη δίψα για πολλά χρόνια, μέχρι που το νερό κατάφερε να καταστεί κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Σημειώνεται ότι το πόσιμο νερό έγινε ευρύτερα διαθέσιμο τον 19ο αιώνα (Peterson, 2013).

Η προέλευση των αλκοολούχων ποτών χάνεται στα στενά της προϊστορίας. Η ζύμωση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε πολτοποιημένο τρόφιμο που περιέχει ζάχαρη, όπως τα σταφύλια, τα δημητριακά, τα μούρα ή το μέλι, που αφήνεται εκτεθειμένο σε θερμό αέρα. Οι ζύμες του ατμοσφαιρικού αέρα επιδρούν στη ζάχαρη, μετατρέποντάς την σε αλκοόλ και διοξείδιο του άνθρακα. Τα αλκοολούχα ποτά ανακαλύφθηκαν έτσι πιθανώς τυχαία από προγεωργικούς πολιτισμούς. Οι πρώτοι λαοί, στους οποίους καταγράφεται η παραγωγή αλκοολούχων ποτών, πιθανότητα ενθουσιάζονταν με την εντυπωσιακή διαδικασία παραγωγής, παρά με τη γεύση τους, και προχώρησαν σε σκόπιμη παραγωγή. Από τη συλλογή απλώς των άγριων πρώτων υλών, προχώρησαν στην τακτική καλλιέργεια της αμπέλου και άλλων κατάλληλων καλλιεργειών. Στην περίπτωση της αμυλώδους βλάστησης, αρκετά πρωτόγονοι γεωπόνοι έμαθαν πώς να μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμη ζάχαρη μέσω προκαταρκτικής μάσησης. Συγκεκριμένα, το σάλιο περιέχει ένα ένζυμο που πραγματοποιεί αυτή τη μετατροπή (Vaillant & Keller, 2007).

Κύριο συστατικό των αλκοολούχων ποτών είναι το αλκοόλ, ή αιθανόλη. Πρόκειται για χημική ένωση, μικρό μοριακού βάρους, και μικρής ανθρακικής αλυσίδας, που ανήκει στην ομόλογη σειρά των αλκοολών. Χαρακτηριστική της ομάδα, αποτελεί η υδροξυλομάδα, που της προσδίδει πολικότητα, και κατ' επέκταση, υψηλή διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες, με σημαντικότερο, το νερό. Το μοριακό της βάρος είναι 46, το σημείο ζέσεως 78 °C και το ειδικό βάρος (στους 15 °C) 0,8. Είναι άχρωμο και άοσμο πτητικό υγρό, στη βασική του κατάσταση (Wyman & Hinman, 1990). Ο μοριακός τύπος είναι CH₃CH₂OH, και ο συντακτικός παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (εικ.1).



Εικόνα 1. Συντακτικός τύπος της αιθανόλης (CH₃CH₂OH), σε τρεις διαστάσεις

(πηγή : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

1.1 Οι Επιπτώσεις της Χρήσης και Κατάχρησης Αιθανόλης στην Υγεία του Ανθρώπου

Η αιθανόλη, κατέχει τα πρωτεία μεταξύ των ευφραντικών ουσιών, όσον αφορά στην κατανάλωση. Στο πεδίο της Δικαστικής Τοξικολογίας, φέρει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον, μιας και η δράση της στον οργανισμό, μπορεί να επιφέρει νόσηση, ή και βίαιο θάνατο (Κουτσελίνης, 2000). Η εκτεταμένη και χρόνια χρήση της, έχει συνδεθεί τόσο με την πλήξη των ζωτικών οργάνων, όσο και με τον κλονισμό της ψυχικής υγείας, με ασθένειες όπως ο αλκοολισμός. Ακόμη, είναι πιθανό να προκληθούν δηλητηριάσεις, με αποτέλεσμα το βίαιο θάνατο του ατόμου (Knight, 2004). Συνεπώς, κρίνεται εξέχουσας σημασίας ο προσδιορισμός της αιθανόλης στον οργανισμό, και η μελέτη γύρω από τη δράση και τις επιπτώσεις της. Ουσιαστική είναι η προσφορά του προσδιορισμού της στη διερεύνηση του τριπτύχου για τη διαλεύκανση των βίαιων θανάτων : «έγκλημα – αυτοκτονία – τυχαίο γεγονός» (Κουτσελίνης, 2000).

Η αιθανόλη πρόκειται για μια ψυχοδραστική χημική ουσία, η οποία καταστέλλει τις λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, αυξάνοντας τη δράση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Davies, 2003). Έτσι, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της, στα διάφορα υλικά βιολογικής προέλευσης, πρόκειται, πλέον, για ανάλυση ρουτίνας. Διενεργείται σε διαπιστευμένα τοξικολογικά εργαστήρια, και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται, τις περισσότερες περιπτώσεις, αποτελούν τμήμα της δικαστικής έρευνας (Sturner et al, 2000). Συνεπώς, η απόδοση ευθυνών και κατηγοριών, σχετικά με την κατανάλωση αιθανόλης, αφορά στη μετρούμενη συγκέντρωσή της, τη στιγμή της δειγματοληψίας. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή και ελληνική νομοθεσία, η αποκαλούμενη «ένοχη» συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, είναι στα 50,0 mg/dL ή 0,5 g/L. Πάνω από το εν λόγω κατώφλι, η δικαιοσύνη δύναται να καταλογίσει ποινικές ευθύνες στους κατηγορούμενους. Στον παρακάτω πίνακα (πιν.1), παρουσιάζονται οι τρόποι σύμφωνα με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί στο αίμα συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 0,8 g/L.

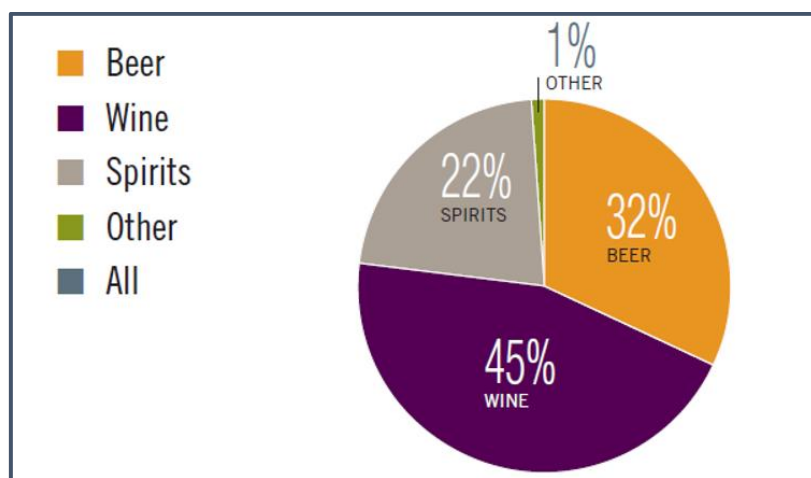
Πίνακας 1. Ποσότητα ποτού ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση αιθανόλης 0,8 g/L αίματος

Ποτό	v/v %	Ποσότητα
Κρασί	14	~ 2,25 ποτήρια
Κονιάκ	48	~ 2 ποτήρια
Μπύρα	5	~ 3 κουτάκια (330 mL)
Ουίσκι	40	~ 2,5 ποτήρια
Τσίπουρο	40	~ 5 σφηνάκια

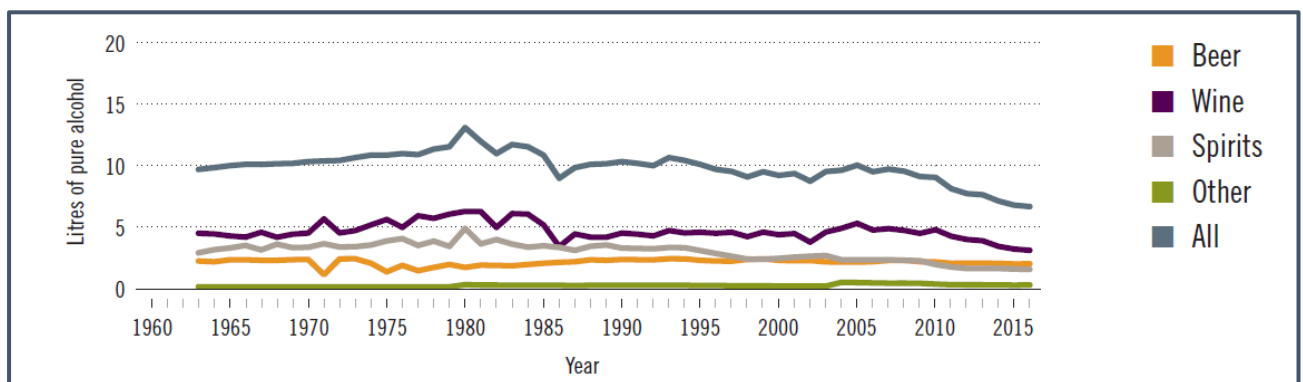
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κατανάλωση αιθανόλης είναι εκτενής παγκοσμίως. Το Παγκόσμιο Σύστημα Πληροφοριών για το Αλκοόλ και την Υγεία (Global Information System on Alcohol and Health - GISAH) είναι ένα ουσιαστικό εργαλείο για την αξιολόγηση και την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας και των τάσεων που σχετίζονται με την κατανάλωση αλκοόλ, τις βλάβες που σχετίζονται με το αλκοόλ και τις πολιτικές απαντήσεις στις χώρες. Η επιβλαβής χρήση αλκοόλ έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο 3 εκατομμυρίων ανθρώπων ετησίως. Υπάρχουν 230 διαφορετικοί τύποι ασθενειών όπου το αλκοόλ φέρει ευθύνες. Επηρεάζει επίσης την ευημερία και την υγεία των ανθρώπων του περιβάλλοντός του. Το 2018, η παγκόσμια συνολική κατανάλωση ήταν ίση με 6,2 λίτρα καθαρού αλκοόλ ανά

άτομο άνω των 15 ετών. Η μη καταγεγραμμένη κατανάλωση αντιπροσωπεύει το 26% της συνολικής παγκόσμιας κατανάλωσης (Hammer et al., 2018).

Στη χώρα μας, σύμφωνα με τα στοιχεία του GISAH, για άτομα άνω των 15 ετών, το 45% του συνολικού πληθυσμού, προτιμά το κρασί. Το 32% τη μπύρα, το 22% οινοπνεύματα, και το εναπομείναν 1%, τα λοιπά αλκοολούχα σκευάσματα. Ακόμη, το χρονικό διάστημα 1961 – 2016, η μεγαλύτερη κατανάλωση καθαρού αλκοόλ σημειώνεται τις χρονολογίες 1979 – 1982, ενώ από το 2012 και έπειτα, διαφαίνεται μια πτώση.



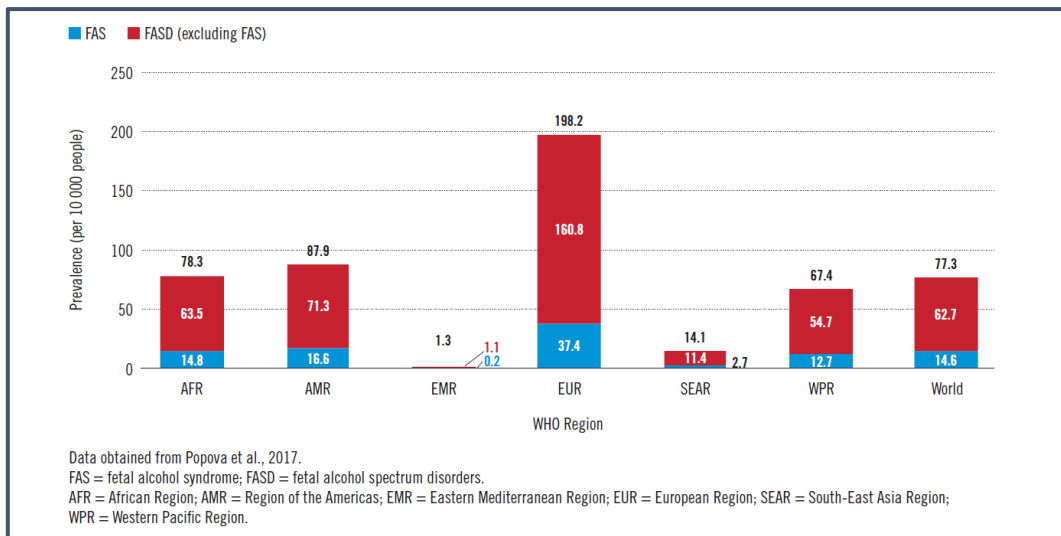
Σχήμα 1. Καταγεγραμμένη κατά κεφαλήν κατανάλωση αλκοόλ (15+) (σε λίτρα καθαρού οινοπνεύματος) ανά είδος αλκοολούχου ποτού, 2016 (GISAH)



Σχήμα 2. Καταγεγραμμένη κατά κεφαλήν κατανάλωση οινοπνεύματος (15+), 1961–2016 (GISAH)

Η χρήση αλκοόλ έχει αντίκτυπο στην υγεία των γυναικών και των παιδιών. Η συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ με τη σεξουαλική επαφή χωρίς προστασία (Scott-Sheldon et al., 2016) (Rehm et al., 2012) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ακούσιας εγκυμοσύνης (Connery et al., 2014) (Lundsberg et al., 2018). Η χρήση αλκοόλ και ναρκωτικών αυξάνει επίσης τον κίνδυνο έκθεσης του εμβρύου στο αλκοόλ λόγω καθυστερημένης αναγνώρισης της εγκυμοσύνης (Connery et al., 2014). Αυτό μπορεί να συνεχίσει να έχει αρνητικές επιπτώσεις για τα νεογέννητα (Schoeps et al., 2018).

Η χρήση αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει καθιερωθεί ως παράγοντας κινδύνου για δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένης της θνησιγένειας, της αυτόματης αποβολής, της πρόωρης γέννησης, της ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης και του χαμηλού βάρους γέννησης (Henriksen et al., 2004; Patra et al., 2010). Ακόμη, μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από ισόβιες καταστάσεις γνωστές ως διαταραχές του φάσματος του εμβρυϊκού αλκοολισμού (Fetal Alcohol Spectrum Disorder – FASD) (Chudley et al., 2005). Το σύνδρομο του εμβρυϊκού αλκοολισμού περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1973, και αποτελεί μια νευροαναπτυξιακή διαταραχή. Ουσιαστικά, πρόκειται για το αποτέλεσμα μιας επίκτητης εγκεφαλικής βλάβης, έπειτα από έκθεση του εμβρύου στο αλκοόλ. Το αλκοόλ που καταναλώνεται από τη μέλλουσα μητέρα, μεταφέρεται και στο κύημα μέσω του πλακούντα από τη μητρική κυκλοφορία, και μεταβολίζεται από τη μητέρα. Το οινόπνευμα που μεταφέρεται είναι επικίνδυνο ακόμη και σε μικρές ποσότητες κατανάλωσης, και προκαλεί βλάβες στο έμβryo, αφού το ίδιο δεν έχει αναπτύξει ακόμη τους κατάλληλους μεταβολικούς μηχανισμούς. Συνεπώς, η ποσότητα του αλκοόλ παραμένει, αφού αυτούσιο εξέρχεται από το έμβryo, επαναδιαλύεται στο αμνιακό υγρό, που αποτελείται κυρίως από νερό, και εντέλει προσλαμβάνεται εκ νέου από το ίδιο, δημιουργώντας έναν κύκλο. Συνεπώς, όσο περισσότερο αλκοόλ καταναλώνει η μητέρα, τόσο σημαντικότερες είναι οι αρνητικές επιπτώσεις στο έμβryo. Ακόμη, το αλκοόλ έχει αναγνωριστεί από αρκετούς ερευνητές ως τερατογόνος ουσία. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί, ότι η κατανάλωση αλκοόλ, και ειδικά η υπέρμετρη, τείνει να επηρεάζει το παιδί και σε μεγαλύτερες ηλικίες. Κυρίως έχουν παρατηρηθεί διαταραχές στη συμπεριφορά, χαμηλές επιδόσεις σχολικά και ακαδημαϊκά, ενώ ορισμένα από αυτά, ανήκουν στο φάσμα του αυτισμού (Gallagher et al., 2018).



Σχήμα 3. Επιπολασμός του συνδρόμου του εμβρυϊκού αλκοολούχου συνδρόμου και των διαταραχών του φάσματος του εμβρυϊκού αλκοόλ στον γενικό πληθυσμό, ανά περιοχή του ΠΟΥ. (GISAH)

Η σχέση μεταξύ της χρήσης αλκοόλ και της επικίνδυνης σεξουαλικής συμπεριφοράς είναι περίπλοκη. Εν γένει, η χρήση αλκοόλ αυξάνει τους κινδύνους γύρω από τη σεξουαλική έκφραση και θα μπορούσε να επηρεάσει παράγοντες όπως η επιλογή συντρόφου και η πιθανότητα σεξουαλικής πράξης χωρίς προστασία (Rehm et al., 2012). Οι μεγαλύτερες ποσότητες αλκοόλ που καταναλώνονται, αντί για τη συχνότητα κατανάλωσής τους, προβλέπουν υψηλότερο σεξουαλικό κίνδυνο (Kalichman et al., 2007). Σε μια μετα-ανάλυση, βασιζόμενη σε 30 πειραματικές μελέτες (Scott-Sheldon et al., 2016) ορίστηκαν τυχαία τα άτομα που θα παραμείνουν νηφάλια ή θα καταναλώσουν αλκοόλ, ώστε να φτάσουν σε περιεκτικότητα αλκοόλ στο αίμα, κατά μέσο όρο, στο 0,07%. Στη συνέχεια, μελέτησαν τη λήψη σεξουαλικών αποφάσεων μετά από κάποια μορφή σεξουαλικής διέγερσης. Διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση αλκοόλ έως την ήπια μέθη «επηρεάζει άμεσα τη λήψη σεξουαλικών αποφάσεων (π.χ. προθέσεις για σεξουαλική επαφή χωρίς προστασία)», που θα οδηγούσε σε αυξημένο κίνδυνο και πιθανώς σε μόλυνση από τον ιό HIV. Επιπλέον, υπάρχει μια γνωστή συσχέτιση μεταξύ της χρήσης αλκοόλ και των παραγόντων κινδύνου - συμπεριλαμβανομένου του σεξ χωρίς προστασία, του σεξ με πολλούς συντρόφους, του σεξ με συναλλαγή και του εξαναγκαστικού σεξ - για τον HIV και τις σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις (Sexually Transmitted Infections – STI) (Woolf-King & Maisto, 2011). Εάν αφεθούν χωρίς θεραπεία, τα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα (ΣΜΝ), ενέχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από τον ιό HIV. Οι γυναίκες τείνουν να είναι περισσότερο

ευάλωτες στους εν λόγω κινδύνους, και κυρίως της συμμετοχής σε πράξεις που ποτέ δεν επέλεξαν. Ως θύτες, κατά τη συντριπτική πλειοψηφία τους, είναι οι σεξουαλικοί σύντροφοί τους, που ανήκουν στο ανδρικό φύλο, και έχουν κάνει χρήση αλκοόλ. Η σεξουαλική βία σχετίζεται τόσο με τη χρήση αλκοόλ όσο και με τον κίνδυνο του HIV (Baliunas et al., 2010).

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν παρατηρήσει μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ του όγκου και των προτύπων κατανάλωσης αλκοόλ και της εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Klatsky, 2015). Συγκεκριμένα, ο όγκος και τα πρότυπα κατανάλωσης αλκοόλ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο υπερτασικής καρδιακής νόσου (Briasoulis et al., 2012), μυοκαρδιοπάθειας, κολπικής μαρμαρυγής, και αιμορραγικά και άλλα μη ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια (Patra et al., 2010).

Υπάρχει μια καθιερωμένη αιτιώδης σχέση μεταξύ της χρήσης αλκοόλ και της ανάπτυξης καρκίνου στο στοματοφάρυγγα, τον λάρυγγα, τον οισοφάγο, το ήπαρ, το κόλον, το ορθό και το γυναικείο στήθος. Οι κίνδυνοι είναι γενικά υψηλότεροι για τις γυναίκες παρά για τους άνδρες. Ακόμη και η μέτρια πρόσληψη αλκοόλ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης γυναικείου καρκίνου του μαστού (Bagnardi et al., 2015). Οι βιολογικοί μηχανισμοί της καρκινογένεσης που σχετίζεται με το αλκοόλ δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά έχουν εντοπιστεί αρκετές βιοχημικές οδοί μέσω των οποίων το αλκοόλ θεωρείται ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου. Συγκεκριμένα, το αλκοόλ έχει αποδειχθεί ότι καταστρέφει μόνιμα τους κλώνους του DNA στο κύτταρο και ότι αναστέλλει τη λειτουργία των διεργασιών επιδιόρθωσής του, ιδιαίτερα μέσω της ακεταλδεϋδης – του άμεσου μεταβολικού προϊόντος του αλκοόλ.

Η αιτιολογική σχέση της κατανάλωσης αλκοόλ και των ηπατικών ασθενειών είναι καλά τεκμηριωμένη και το αλκοόλ έχει αποδειχθεί ότι έχει την ικανότητα να προκαλεί ηπατοκυτταρική βλάβη μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με το μεταβολισμό της αιθανόλης και υποσιτισμού (Gao & Bataller, 2011). Το αλκοόλ είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες ηπατικής νόσου. Οι υποτύποι ηπατικής νόσου που σχετίζονται με το αλκοόλ περιλαμβάνουν την αλκοολική ηπατίτιδα, τη στεάτωση, τη στεατοηπατίτιδα, την ίνωση και την κίρρωση. Η οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και η κίρρωση του ήπατος σχετίζονται με υψηλή θνησιμότητα (η οποία μπορεί να φτάσει το 50% στην οξεία αλκοολική ηπατίτιδα) και ο διάμεσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών με προχωρημένη ηπατική κίρρωση μπορεί να είναι τόσο χαμηλός όσο 1-2 χρόνια (Bruha et al., 2012).

Οι διαταραχές χρήσης αλκοόλ (Alcohol Use Disorders – AUDs), συμπεριλαμβανομένης της εξάρτησης από το αλκοόλ και των επιβλαβών προτύπων χρήσης αλκοόλ, είναι αρκετά συχνές (και σε μεγάλο βαθμό μη θεραπευόμενες) καταστάσεις ψυχικής υγείας που σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα (Connor et al., 2016). Ένα ευρύ φάσμα κοινωνικών και διαπροσωπικών προβλημάτων που σχετίζονται με το αλκοόλ συχνά συνδέονται άμεσα με την δηλητηρίαση από το αλκοόλ.

Η δηλητηρίαση από το αλκοόλ δεν είναι μόνο η διαγνωστική κατηγορία που ορίζει μια συγκεκριμένη κατάσταση ψυχικής υγείας που προκαλείται από το αλκοόλ και μια πολύ κοινή παροδική κατάσταση μεταξύ των πότων, αλλά είναι επίσης ο τρίτος από τους τρεις, συνολικά, γενικούς μηχανισμούς βλάβης που σχετίζεται με το αλκοόλ που αναφέρθηκαν παραπάνω (τοξικές επιδράσεις του αλκοόλ, εξάρτηση, μέθη). Αυτή η διάσταση του αντίκτυπου της κατανάλωσης οινοπνεύματος συχνά αφήνεται στην αστυνομία, τα συστήματα πρόνοιας και δικαιοσύνης να επιλύσουν, αλλά θα πρέπει να αποτελεί μείζον μέλημα για τη δημόσια υγεία.

Η αιθανόλη, πρόκειται για μια ψυχοτρόπο ουσία, που επηρεάζει σημαντικά τις νευρικές συνάψεις και τμήματα του εγκεφάλου. Η επιρροή αυτή, εξαρτάται από παράγοντες όπως η δοσολογία, τα γονίδια, η ανοχή και η εξάρτηση από το αλκοόλ, το φύλο του καταναλωτή, η ηλικία, η ιδιοσυγκρασία, καθώς και η αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα (Giancola et al., 2010). Οι πιθανές επιπτώσεις του αλκοόλ περιλαμβάνουν έκπτωση στην προσοχή, τη γνωστική ικανότητα και την επιδεξιότητα (που είναι σημαντικές για δραστηριότητες όπως η οδήγηση αυτοκινήτου). Ακόμη, εκδηλώνονται επιθετικές παρορμήσεις και η απώλεια ελέγχου της συμπεριφοράς (σημαντικό για την εγκληματική βία), ενώ η δηλητηρίαση από το αλκοόλ μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Καθένα από αυτά τα αποτελέσματα τείνει να επηρεάζει τον πότη, κατά μέσο όρο, σε διαφορετικό όριο. Η μετρίαση της ικανότητας οδήγησης εμφανίζεται σε BAC κάτω του 0,05%, η επιθετική συμπεριφορά σε BAC περίπου 0,075% (Duke et al., 2011), ενώ η υπερβολική δόση σε BAC περίπου 0,35% (Gable, 2004). Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση σε αυτές τις επιδράσεις, όχι μόνο ως προς την ποσότητα του αλκοόλ που τις επιταχύνει, αλλά επίσης, για ορισμένες επιδράσεις, ως προς συχνότητα κατά την οποία εμφανίζονται. Για παράδειγμα, μόνο μια μειοψηφία του πληθυσμού θα εκδηλώσει επιθετικότητα (Giancola et al., 2010).

Η κατανάλωση αλκοόλ από τον δράστη ή το θύμα ή και από τους δύο αποτελούν συχνά παράγοντα ανθρωποκτονίας, η οποία είναι αναμφισβήτητα η πιο ακραία μορφή επιθετικότητας. Η σύνδεση μεταξύ της κατανάλωσης οινοπνεύματος και της ανθρωποκτονίας

είναι ισχυρότερη σε κοινωνίες όπου η κατανάλωση αλκοόλ είναι συχνά αρκετά βαριά ώστε να προκαλέσει μέθη. Έτσι, οι αλλαγές στο επίπεδο κατανάλωσης αλκοόλ στον πληθυσμό έχουν σημαντικά ισχυρότερη επίδραση στα ποσοστά ανθρωποκτονιών στη βόρεια και ανατολική Ευρώπη από ό,τι στη νότια Ευρώπη (Rossow, 2001). Οι μελέτες για την κατανάλωση αλκοόλ από τον δράστη και από το θύμα σε ανθρωποκτονίες έχουν γίνει κυρίως σε κοινωνίες όπου η κατανάλωση αλκοόλ έως τη μέθη είναι κοινή. Οι μετα-αναλύσεις αυτών των μελετών έχουν βρει ότι το 48% τόσο των θυμάτων όσο και των δραστών είχαν πει όταν συνέβη η ανθρωποκτονία και ότι το 37% των δραστών και το 33-35% των θυμάτων είχαν πει αρκετά ώστε να είναι μεθυσμένοι (Kuhns et al., 2014).

1.2 Η Αιθανόλη στον Οργανισμό

Η ανίχνευση της αιθανόλης στον οργανισμό, δε συνεπάγεται απαραίτητα την κατανάλωσή της. Ειδικά σε ό,τι αφορά το νεκροτομικό βιολογικό υλικό, η αξιολόγηση της προέλευσής της, καθώς και της συγκέντρωσής της, απαιτεί μια σύνθετη εργαστηριακή πορεία. Τα δείγματα, παραλαμβάνονται κατά τη διενέργεια νεκροψίας – νεκροτομής, από τους ειδικούς Ιατροδικαστές ή νεκροτόμους, και φέρονται στο Τοξικολογικό εργαστήριο. Σε περιπτώσεις όπου οι σηπτικές εξεργασίες είναι προηγμένες, καθίσταται αδύνατη η μέτρηση της ποσότητας αιθανόλης που υπήρχε στο αίμα ακριβώς τη στιγμή του θανάτου, για λόγους που θα περιγραφούν αναλυτικά στη συνέχεια.

Ωστόσο, τρεις (3) είναι οι παράγοντες στους οποίους οφείλεται η παρουσία αιθανόλης σε βιολογικά υλικά που έχουν συλλεχθεί μεταθανάτια. Πρώτον, η κατανάλωση αιθανόλης από το άτομο, όσο βρισκόταν «εν ζωή», μέσω αλκοολούχων ποτών. Δεύτερον, η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης. Η εν λόγω παραγωγή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε στο πτώμα, από τους αποικοδομητές μικροοργανισμούς που υπάρχουν και λαμβάνουν δράση κατά τη σήψη, είτε στα βιολογικά υλικά, από τη στιγμή της δειγματοληψίας τους και μετά. Τέλος, η ενδογενής αλκοολογένεση. Πρόκειται για παραγωγή αιθανόλης στο άτομο, ενόσω αυτό είναι «εν ζωή» και οφείλεται στις μικροβιακές ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα στην κοιλιακή περιοχή, κυρίως στο έντερο. Προφανώς, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το είδος των βιολογικών υλικών που είναι διαθέσιμα σε κάθε περίπτωση, η ποιότητά τους καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης, πριν την ανάλυση.

Η επικράτηση τόσο της χρήσης, όσο και της κατάχρησης αιθανόλης σε όλους τους κοινωνικούς τομείς, ένα ευρύ φάσμα τύπων, περιπτώσεων και δειγμάτων υποβάλλονται στα Εργαστήρια Δικαστικής Τοξικολογίας για ανάλυση αιθανόλης. Τα σύγχρονα εργαστήρια

οφείλουν να αναπτύξουν μεθόδους που να είναι κατάλληλες, ακέραιες, ευαίσθητες και στοχευμένες, ακολουθώντας τα εθνικά και διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO/IEC 17025), ενώ θα πρέπει επίσης να λαμβάνουν υπόψη πρόσθετους παράγοντες για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε δικαστικές υποθέσεις. Αυτά περιλαμβάνουν τις συνθήκες του θανάτου, εάν υπάρχει ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ, το είδος του δείγματος και το σημείο συλλογής, εάν το δείγμα έχει συλλεχθεί σε κατάλληλο δοχείο δείγματος με συντηρητικό και έχει αποθηκευτεί στη σωστή θερμοκρασία. Επιπλέον, ανάλογα με τον τύπο της περίπτωσης και τη διαθεσιμότητα των δειγμάτων, η αναγνώριση συγκεκριμένων βιοδεικτών αιθανόλης θα μπορούσε να προσφέρει σημαντική εικόνα για το ρόλο της αιθανόλης.

Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό για τους δικαστικούς τοξικολόγους να κατανοήσουν, εκτός από την κατανομή και την αποβολή του αλκοόλ από το σώμα, άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα της αιθανόλης, τους βιοδείκτες της, καθώς και σχετικές πτητικές ουσίες για να βοηθήσουν στην ερμηνεία της μετρούμενης συγκέντρωσης.

1.3 Η Φαρμακοκινητική της Αιθανόλης

Η φαρμακοκινητική εξετάζει την πορεία μιας φαρμακευτικής ουσίας μέσα στο σώμα, από την πρόσληψή της, μέχρι και την απομάκρυνσή της. Τα στάδια που ακολουθούνται είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση. Η απορρόφηση είναι η διαδικασία με την οποία ένα φάρμακο ή ένα δηλητήριο ή, στη συγκεκριμένη περίπτωση, το αλκοόλ περνά από το σημείο χορήγησης στην κυκλοφορία του αίματος, και διανέμεται σε όλα τα σωματικά υγρά και τους ιστούς. Μικρές ποσότητες αλκοόλ μπορούν να εισέλθουν στο αίμα με απορρόφηση μέσω των βλεννογόνων επιφανειών της στοματικής κοιλότητας, ειδικά εάν ένα ποτό κρατηθεί στο στόμα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να καταποθεί. Αλλά για όλους τους πρακτικούς σκοπούς, τα αλκοολούχα ποτά λαμβάνονται από το στόμα και η απορρόφηση από το γαστρεντερικό κανάλι γίνεται με παθητική διάχυση στον αυλό του εντέρου, σε ρυθμούς που εξαρτώνται από την επικρατούσα κλίση συγκέντρωσης σύμφωνα με το νόμο του Fick (Roberts & Robinson, 2007). Σύμφωνα με το νόμο αυτό, τα αλκοολούχα ποτά μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε αιθανόλη, διαχέονται γρηγορότερα μεταξύ των βιολογικών μεμβρανών, σε σχέση με τα «ελαφρύτερα» αλκοολούχα ποτά. Ακόμη, είναι πιθανή και η διαδερμική απορρόφηση, αλλά είναι ελάχιστη, και επουδενί δεν οδηγεί σε τοξικά αποτελέσματα.

Επειδή η αιθανόλη είναι ήδη σε υγρή μορφή, δεν είναι απαραίτητη η διάλυσή της για να συμβεί η απορρόφηση, πράγμα που σημαίνει ότι η χρονική καθυστέρηση της απορρόφησης είναι αμελητέα και η αιθανόλη είναι μετρήσιμη στο αίμα αμέσως μετά την έναρξη της κατανάλωσης. Σε αντιπαραβολή με τα φάρμακα που λαμβάνονται με τη μορφή δισκίων, η απορρόφησή τους προαπαιτεί τη διάλυσή τους, ενώ η ταχύτητα και η έκταση της απορρόφησης εξαρτάται από τις ιδιότητες του μητρικού φαρμάκου, όπως την pK_a και τη λιποφιλικότητά του. Αυτό οδηγεί σε έναν αξιόλογο χρόνο καθυστέρησης πριν η δραστική ουσία είναι ανιχνεύσιμη στη φλεβική κυκλοφορία του αίματος.

Η απορρόφηση της αιθανόλης πραγματοποιείται εξίσου εύκολα στο στόμαχο και το λεπτό έντερο, ενώ είναι ταχύτερη από το πάνω μέρος του εντέρου (εγγύς λεπτό έντερο), λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας απορρόφησης που παρέχεται από τις λάχνες και τις μικρολάχνες του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας. Ακόμη, είναι εξαιρετικά ταχύτερη σε στόμαχο που στερείται περιεχομένου, με αποτέλεσμα να φτάσει μέχρι και το 50% της συνολικής ποσότητας που λαμβάνεται. Το υπόλοιπο απορροφάται εντερικά.

Ο βαθμός κατά τον οποίο απορροφάται η αιθανόλη, εξαρτάται από την ύπαρξη και το είδος της τροφής στο στόμαχο, την ποσότητα και τη συγκέντρωση της αιθανόλης, την κατάσταση του βλεννογόνου, καθώς και ατομικούς παράγοντες, όπως η ψυχική κατάσταση, η διάθεση και η σωματική διάπλαση. Σημειώνεται δε, ότι η ταχύτητα απορρόφησης σε άτομα με γαστρεκτομή ή άτομα που έχουν επιτύχει σημαντικό βαθμό ανοχής, είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, η ύπαρξη τροφής στο στομάχι, είναι ικανή να καθυστερήσει σημαντικά την απορρόφηση του οινοπνεύματος, ιδίως αν έχουν λιπαρή βάση. Υπενθυμίζεται ότι η αιθανόλη είναι υδατοδιαλυτή, συνεπώς, δεν διαλύεται σε αυτό το υπόστρωμα. Η καθυστέρηση στην απορρόφηση της αιθανόλης, οδηγεί σε ελαττωμένες στάθμες αλκοόλης στο αίμα, ενώ όσο περισσότερο διαρκεί η απορρόφηση, τόσο χαμηλότερες στάθμες δημιουργούνται. Στο παρακάτω σχήμα (σχ. 4), συνοψίζονται οι παράγοντες που επηρεάζουν το BAC στο σώμα μετά την κατανάλωση αλκοόλ.

Μετά την απορρόφηση από το στομάχι και το λεπτό έντερο, η αιθανόλη εισέρχεται στο αίμα της πυλαίας φλέβας και μεταφέρεται πρώτα στο ήπαρ, μετά στη δεξιά πλευρά της καρδιάς και μέσω των πνευμόνων, πίσω στην καρδιά και σε όλη τη συστηματική κυκλοφορία. Κατά την αρχόμενη απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, η συγκέντρωση του αλκοόλ στην πυλαία φλέβα σημειώνει τα υψηλότερα επίπεδα, από οπουδήποτε αλλού στο σώμα. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση την πυλαία φλέβα ελαττώνεται, αφού πλέον το οινόπνευμα οδεύει

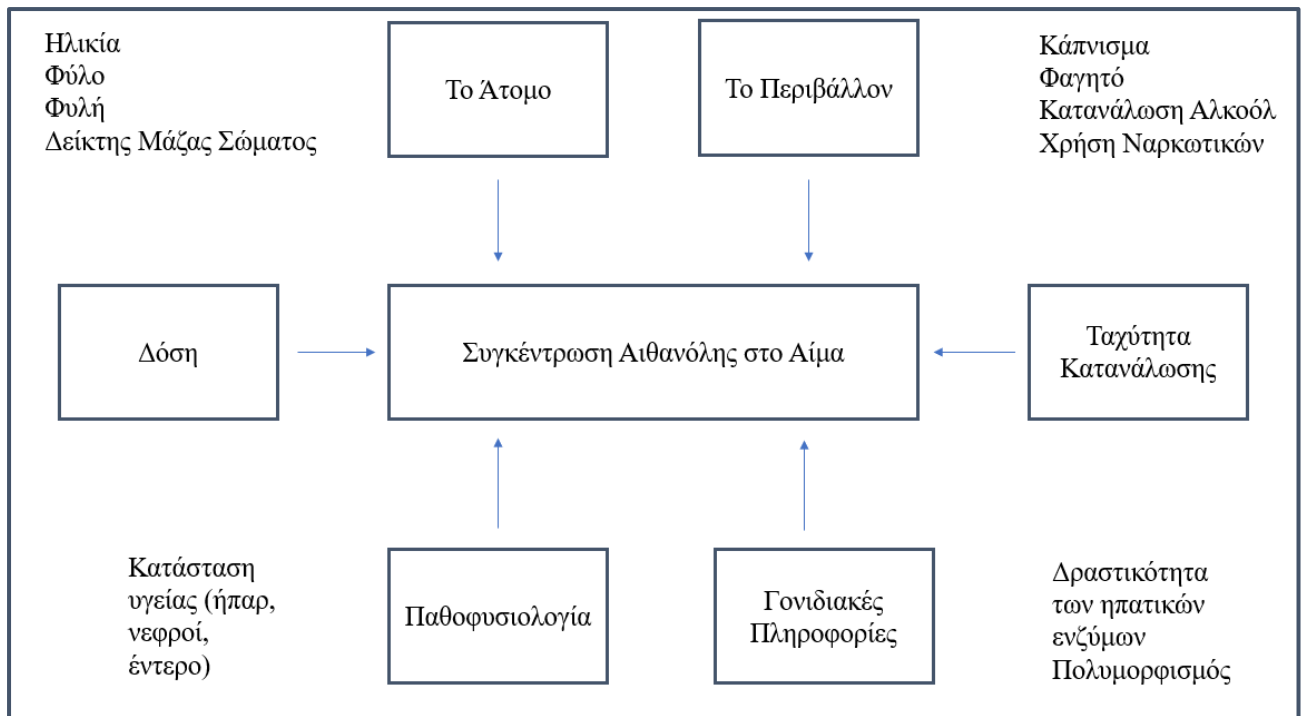
προς το ήπαρ, και αναμιγνύεται με το αίμα της ηπατικής αρτηρίας. Μετά τη διέλευση της αιθανόλης από τη δεξιά καρδιά και την κυκλοφορία με το αίμα των πνευμονικών αρτηριακών κλάδων στους πνεύμονες, ξεκινά η σταδιακή απομάκρυνσή της με τον κυψελιδικό αέρα. Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα μειώνεται περαιτέρω, με την κατανομή της στους ιστούς του σώματος, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε νερό. Η κατανομή αυτή πραγματοποιείται μέσω της μεγάλης κυκλοφορίας του αίματος και του τριχοειδικού αγγειακού δικτύου.

Θεωρείται ότι οι γυναίκες διαθέτουν χαμηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας σε νερό από τους άνδρες, λόγω της μικρότερης μάζας σώματος και της υψηλότερης αναλογίας σωματικού λίπους. Ωστόσο, οι γυναίκες επιτυγχάνουν υψηλότερη συγκέντρωση αλκοόλ στο αίμα από τους άνδρες μετά την κατανάλωση της ίδιας ποσότητας αλκοόλ. Το 50–60% του σωματικού βάρους ενός ατόμου είναι νερό. Το ποσοστό αυτό σημειώνεται υψηλότερο κατά μέσο όρο στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες, λόγω των διαφορών στην περιεκτικότητα σε λίπος ανά κιλό σωματικού βάρους, που αποτελεί βασικό γνώρισμα των δύο φύλων (EDELMAN et al., 1952). Ο όγκος του αίματος είναι περίπου 70–80 mL/kg σωματικού βάρους, ανεξάρτητα από το φύλο, που αντιστοιχεί σε 4,9–5,6 L, σε ένα άτομο που ζυγίζει 70 kg. Όσον αφορά στην υδατοδιαλυτή αιθανόλη, ο όγκος της κατανομής αντιστοιχεί πολύ στενά με το συνολικό νερό του (Norberg et al., 2001). Όσο ψηλότερο και βαρύτερο σωματικά είναι το άτομο, τόσο περισσότερο είναι και το υδατικό περιεχόμενο που διατίθεται για την αραίωση της αιθανόλης που προσλαμβάνεται. Για το λόγο αυτό, στην πειραματική έρευνα για το αλκοόλ, η δόση της αιθανόλης χορηγείται σχεδόν πάντα ανά κιλό σωματικού βάρους ή ανά κιλό σωματικού νερού, γεγονός που επιτρέπει άμεσες συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ατόμων με διαφορετικό σωματικό βάρος. Ακόμη, όσον αφορά σε παχύσαρκα άτομα, ο όγκος κατανομής της αιθανόλης αναμένεται να είναι μικρότερος, σε σύγκριση με τα άτομα που εμφανίζουν κανονικό Δείκτη Μάζας Σώματος, επειδή η αιθανόλη είναι ουσιαστικά αδιάλυτη στα λιπίδια και πλήρως αναμίξιμη στο νερό (Cheymol, 2000).

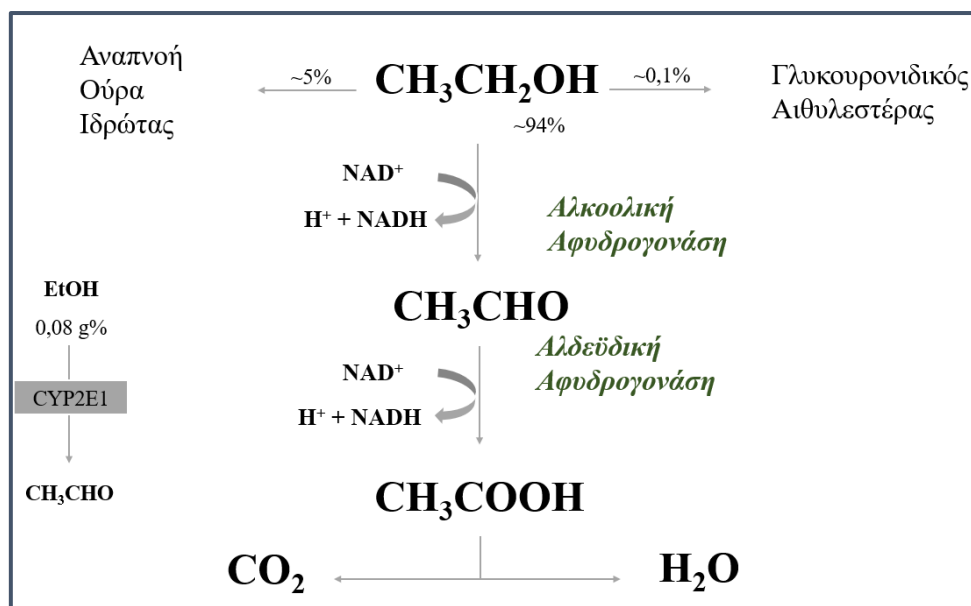
Έπειτα επέρχεται πλήρης ισορροπία, παρόλη την αρχική διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων σε φλεβικό και αρτηριακό αίμα. Ο ρυθμός εξισορρόπησης της αιθανόλης μεταξύ του υδατικού κλάσματος του αίματος και των εξωκυτταρικών υγρών και ιστού εξαρτάται από την περιοχή διατομής του τοπικού τριχοειδούς στρώματος και τη ροή του αίματος ανά γραμμάριο ιστού. Όργανα με πλούσια παροχή αίματος, όπως ο εγκέφαλος και τα νεφρά, ισορροπούν γρήγορα με την αιθανόλη στο αίμα, ενώ οι ογκώδεις σκελετικοί μύες με χαμηλότερη αναλογία ροής αίματος προς μάζα ιστού ισορροπούν πιο αργά.

Ο μεταβολισμός της αιθανόλης, πραγματοποιείται πρωταρχικά μέσω της οξειδωσής της σε ακεταλδεΐδη (CH_3CHO), καταλύομενη από το ένζυμο «αλκοολική αφυδρογονάση (Alcohol Dehydrogenase, ADH)». Στη συνέχεια, το ένζυμο της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης (Aldehyde Dehydrogenase, ALDH), μετατρέπει την ακεταλδεΐδη σε οξικό οξύ (CH_3COOH), το οποίο μετατρέπεται ταχύτατα σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα στον κύκλο του Krebs. Πρόκειται για μια ενζυμική διεργασία, δύο σταδίων, και απαιτεί σαν συμπράγοντα το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) (Lo et al., 2015). Περίπου το 5% απεκκρίνεται αμετάβλητο με την αναπνοή, τα ούρα και τον ιδρώτα. Λιγότερο από 0,1% υφίσταται μη οξειδωτικό μεταβολισμό στο ήπαρ σε μια αντίδραση σύζευξης φάσης II για την παραγωγή ενός υδατοδιαλυτού μεταβολίτη αιθυλογλυκουρονίδιο, ο οποίος στη συνέχεια απεκκρίνεται στα ούρα. Παρακάτω, ο μεταβολισμός της αιθανόλης, παρουσιάζεται σχηματικά (σχ.5).

Εκτός από την κύρια μεταβολική οδό, υπάρχουν δύο δευτερεύουσες οξειδωτικές οδοί για τη μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Η οδός μέσω του κυτοχρώματος P4502E1 (CYP2E1) πραγματοποιείται επίσης στο ήπαρ (Lieber, 1999). Το CYP2E1 είναι επαγωγίμο, λαμβάνοντας έτσι υπόψη τον αυξημένο ρυθμό μεταβολισμού του αλκοόλ που παρατηρείται σε χρόνιους πότες σε υψηλό BAC (Ueno et al., 1996). Η επόμενη δευτερεύουσα οξειδωτική οδός περιλαμβάνει το ένζυμο καταλάση, το οποίο παρουσία υπεροξειδίων οξειδώνει την αιθανόλη προς ακεταλδεΐδη και οξικό οξύ (Lands, 1998). Αυτή η οδός μπορεί να δρα στον εγκέφαλο όπου κανένα άλλο ένζυμο δεν είναι γνωστό ότι μεταβολίζει αξιόλογες ποσότητες αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Συνολικά, ο μεταβολισμός της αιθανόλης που δεν καταλύεται από την ADH, αντιπροσωπεύει όχι περισσότερο από το 10% του συνολικού μεταβολισμού EtOH (Cornell et al. 1979).



Σχήμα 4. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη Συγκέντρωση Αιθανόλης στο Αίμα (A. W. Jones, 2003)



Σχήμα 5. Ο Οξειδωτικός Μεταβολισμός της Αιθανόλης (A. W. Jones, 2003)

Η αποβολή της αιθανόλης από το σώμα γίνεται κυρίως μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού, από ένα ισοένζυμο Τάξης I της ADH στο ήπαρ. Η αιθανόλη είναι ένα παράδειγμα φαρμάκου στο οποίο εφαρμόζεται η κινητική του ενζυμικού μοντέλου Michaelis-Menten. Η ADH κορρέννται με υπόστρωμα από τα πρώτα λίγα ποτά και, επομένως, ο μεταβολικός ρυθμός της

αιθανόλης ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης, που είναι επαρκής για να περιγράψει την φθίνουσα φάση του προφίλ της BAC στα περισσότερα δικαστικά περιστατικά ($BAC > 20$ mg/dL) (Alan Wayne Jones, 2010). Όταν το BAC μειώνεται κάτω από τα 10 mg/dL, η ADH δεν είναι πλέον κορεσμένη και ο ρυθμός διάσπασης ακολουθεί, πλέον, κινητική πρώτης τάξης. Η κινητική πρώτης τάξης εμφανίζει γραμμικότητα, συνεπώς, στη μονάδα του χρόνου, αποβάλλεται ένα κλάσμα αιθανόλης. (A W Jones & Pounder, 1998).

Ο ρυθμός αποβολής του οινοπνεύματος, σε άτομα με άδειο στομάχι αναφέρθηκε ότι είναι χαμηλότερος από ό,τι σε άτομα που έχουν λάβει τροφή. Η παρουσία της τροφής στο στομάχι ενισχύει τον ρυθμό μεταβολισμού της αιθανόλης και το προφίλ της BAC επανέρχεται στο μηδέν νωρίτερα από ό,τι με άδειο στομάχι, έπειτα από κατανάλωση ίδιας δόσης αιθανόλης. Πιστεύεται ότι η αιθανόλη αλληλεπιδρά και συνδέεται με κάποιο αμινοξύ, όπως η γλυκίνη (Alan Wayne Jones, 2010). Η τροφή στο στομάχι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος όχι μόνο για τη μείωση και την καθυστέρηση της επίτευξης της μέγιστης τιμής BAC, αλλά και για την αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης της αιθανόλης από το σώμα. Η τροφή αυξάνει τη ροή του αίματος στο ήπαρ, καθιστώντας το πιο αποτελεσματικό και διευκολύνοντας την έκθεση της αιθανόλης στα ένζυμα του μεταβολισμού της (A W Jones & Pounder, 1998).

Σύμφωνα με έρευνα σχετικά με τα ποσοστά αποβολής αιθανόλης που διεξήχθη από τον Jones, (Alan Wayne Jones, 2010), συνήχθη το συμπέρασμα ότι οι φυσιολογικοί ρυθμοί αποβολής αιθανόλης κυμαίνονται από 10 – 35 mg αιθανόλης/ 100 mL/h. Σε άτομα που αναφέρουν μέτρια χρήση αλκοόλ, ο ρυθμός υπολογίζεται στα 15 mg/100 mL ανά ώρα, ενώ στους συλληφθέντες οδηγούς, στα 19 mg/100 mL/h, πολλοί από τους οποίους, στατιστικά, ήταν αλκοολικοί, ή κατανάλωναν αλκοόλ σε υπερβολικές ποσότητες. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας αυτής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εγχειρίδιο όταν προκύπτουν ερωτήματα σχετικά με το μεταβολικό ρυθμό αλκοόλ, σε εγκλήματα που σχετίζονται με αυτό. Οι εξαιρετικά γρήγοροι ρυθμοί που ευθύνονται για τον γρήγορο μεταβολισμό θα μπορούσαν να σχετίζονται με την επαγωγή της οξειδωσης της αιθανόλης στην οδό του ενζύμου CYP2E1, ως συνέπεια της έντονης κατανάλωσης οινοπνεύματος. Ωστόσο, η δόση και η διάρκεια της κατανάλωσης που απαιτούνται για την ενίσχυση των ενζύμων του CYP2E1 δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί (Alan Wayne Jones, 2008). Η αποτοξίνωση με υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και η γενετική προδιάθεση του υπερμεταβολικού ρυθμού θα μπορούσαν να είναι ένας άλλος λόγος για την εξαιρετικά γρήγορη αποβολή της αιθανόλης (A. W. Jones, 1993).

Σε περιπτώσεις που επέρχεται ηπατική αλλοίωση ή κίρρωση, ο μεταβολισμός της αιθανόλης επιβραδύνεται, ή αναστέλλεται. Το ποσό της αιθανόλης που δεν κατάφερε να μεταβολιστεί, αποβάλλεται αυτούσιο με τα ούρα, τον ιδρώτα, το σάλιο, τον εκπνεόμενο αέρα και το παχύ έντερο. Η ποσότητα που αποβάλλεται μέσω του ιδρώτα δεν είναι αξιόλογο, εκτός αν επικρατούν καταστάσεις υπερθερμίας ή εφίδρωσης. Σε κανονικές συνθήκες, η ποσότητα αιθανόλης που αποβάλλεται μέσω του ιδρώτα είναι περίπου η μισή από αυτήν που αποβάλλεται με τα ούρα, ενώ στις έντονες καταστάσεις εφίδρωσης, το ποσό αυτό μπορεί και να δεκαπλασιαστεί. Ακόμη, η αποβολή με τον εκπνεόμενο αέρα, υπακούει τους νόμους των αερίων, και επέρχεται ισορροπία στην κυψελιδική μεμβράνη, όταν η σχέση κυψελιδικού αέρα και κυψελιδικού τριχοειδούς γίνει 2100:1. Αυτό σημαίνει ότι η ίδια ποσότητα αιθανόλης, που περιέχεται σε 1 cm³ αίματος, κατανέμεται σε 2100 cm³ κυψελιδικού αέρα. Σημειώνεται ότι η εισπνοή αέρα πλούσιου σε αλκοόλη για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, σπάνια προκαλεί κινδύνους. Τέλος, η αναλογία ποσότητας οινοπνεύματος σε ούρα και αίμα, μετά την επίτευξη της ισορροπίας, είναι 1:1,3, και αφορά σε ούρα που προέρχονται από τους ουρητήρες. Αν και είναι δυσχερής η συλλογή ούρων από τους ουρητήρες, αποτελούν το καλύτερο δείγμα.

1.3.1 Μη-οξειδωτικός Μεταβολισμός της Αιθανόλης

Αν και η ποσότητα της αιθανόλης που υπόκειται σε μη-οξειδωτικό μεταβολισμό είναι μικρή, τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτή την οδό, εμφανίζουν διαγνωστικό ενδιαφέρον. Τα βασικότερα παράγωγα του μη-οξειδωτικού μεταβολισμού είναι οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, η φωσφατιδυλοαιθανόλη, το αιθυλογλυκουρονίδιο και ο θειϊκός αιθυλεστέρας (Ewa Czech, 2002)

Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Ethyl Esters, FAEs), προέρχονται από την αντίδραση μεταξύ αιθανόλης και λιπαρών οξέων, η οποία καταλύεται από τις συνθάσες των FAEs, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται, σε μεγάλες ποσότητες, στο ήπαρ και το πάγκρεας, καθώς επίσης και στον εγκέφαλο, την καρδιά και το αίμα (Cederbaum, 2012; Ewa Czech, 2002; Zakhari, 2006).

Για το σχηματισμό της φωσφατιδυλοαιθανόλης (PEth), ευθύνεται το ένζυμο φωσφολιπάση D. Το εν λόγω ένζυμο μετατρέπει τη φωσφατιδυλοχολίνη σε φωσφατιδυλοαιθανόλη, μέσω αντίδρασης τρανσφωσφατιδυλίωσης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μόνο παρουσία αιθανόλης. Σε αντίθετη περίπτωση, παράγεται φωσφατιδικό οξύ. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στον εγκέφαλο, το αίμα και το νεφρικό ιστό (Ewa Czech, 2002; Zakhari, 2006).

Στο ήπαρ, το ένζυμο ουριδινό-5'-διφωσφο-γλυκουρονοσυλτρανσφεράση (UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράση) καταλύει την αντίδραση μεταξύ αιθανόλης και γλυκουρονικού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αιθυλογλυκουρονιδίου (EtG). Η UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράση υπάρχει επίσης σε άλλους ιστούς όπως των νεφρών, του υπερνεφρικού αδένου, του σπλήνα και άλλων. Αυτός ο δείκτης δεν είναι ανιχνεύσιμος όταν δεν έχει υπάρξει πρόσληψη αιθανόλης (Cederbaum, 2012; Ewa Czech, 2002). Εκτός από τη γλυκουρονίωση, η αιθανόλη συζευγνύεται με θειικό άλας στο ήπαρ, για να σχηματίσει θειϊκό αιθυλεστέρα (EtS). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από κυτταροπλασματικές σουλφοτρανσφεράσες. Υπολογίζεται ότι λιγότερο από το 0,1% της ποσότητας αιθανόλης που προσλαμβάνεται αποβάλλεται ως EtS (Helander & Beck, 2005).

1.3.2 Φαρμακολογικές Επιδράσεις της Αιθανόλης

Η βασική δράση της αιθανόλης ασκείται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και μπορεί να χαρακτηριστεί ως υπνωτικό και αναισθητικό φάρμακο. Κατά την έναρξη κατανάλωσης αλκοόλ, διακρίνεται μια διεγερτική ενέργεια. Ακόμη και αυτή, αποδίδεται στην καταστολή των ανώτερων εγκεφαλικών κέντρων, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη συμπεριφορά.

Η αιθανόλη επηρεάζει τη συμπεριφορά, τη συνείδηση, καθώς και τη λειτουργία του κυκλοφορικού και γαστρεντερικού συστήματος, όπως και των νεφρών. Το αίσθημα θερμότητας στο δέρμα, έπειτα από την κατάποση αλκοόλης, οφείλεται στην αγγειοδιαστολή στο δέρμα, η οποία δεν πρόκειται για άμεση επίδραση της αιθανόλης στα αγγεία, αλλά έμμεση, ως συνέπεια των κεντρικών ενεργειών της αιθανόλης. Κατά την κοινή πεποίθηση, η αιθανόλη διαστέλλει και τα στεφανιαία αγγεία, κάτι που δεν αποδεικνύεται από τα αντίστοιχα ηλεκτροκαρδιογραφήματα των ασθενών με στεφανιαία ανεπάρκεια. Ενδεχομένως να ελαττώνει το προκάρδιο άλγος, αλλά μάλλον πρόκειται για εγκεφαλική δράση, παρά απευθείας δράση στα στεφανιαία αγγεία. Τέλος, η αιθανόλη είναι τοξική για τις μυοκαρδιακές ίνες, όπως απέδειξαν πειράματα σε πειραματόζωα.

Με την κατανάλωση αιθανόλης, παρατηρείται αύξηση στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι. Πιθανότατα οφείλεται στην απελευθέρωση ισταμίνης ή γαστρίνης από ο γαστρικό βλεννογόνο. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη διούρηση. Δύο είναι οι παράγοντες στους οποίους αποδίδεται το φαινόμενο αυτό: αφενός η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων υγρών, ιδίως στην περίπτωση της μπίρας, και αφετέρου η αιθανόλη καταστέλλει την έκλυση αντιδιουρητικής ορμόνης, από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης.

Από την κατανάλωση αιθανόλης, επηρεάζεται και ο μεταβολισμός των λιπών και των υδατανθράκων. Άτομα που λαμβάνουν 35 – 50 ml αιθανόλης, έπειτα από νηστεία δύο ημερών, οδηγούνται σε εμφάνιση υπογλυκαιμίας. Τούτο συμβαίνει καθώς το επίπεδο του ηπατικού γλυκογόνου είναι χαμηλό, αφού η γλυκόζη του αίματος παραμένει σταθερή σε χαμηλά επίπεδα, ενώ χορηγείται γλυκαγόνη. Έχει αποδειχθεί πειραματικά, ότι η αιθανόλη αναστέλλει τη σύνθεση γλυκογόνου, παρεμποδίζοντας τη γλυκονεογένεση από αμινοξέα.

Η υπερλιπιδαιμία σχετίζεται συχνά με την κατανάλωση αλκοόλ. Διακρίνεται στην οξεία υπερλιπιδαιμία, που ακολουθεί την κατανάλωση αλκοόλ, και την υπερλιπιδαιμία του χρόνιου αλκοολισμού, με διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς. Η οξεία υπερλιπιδαιμία οφείλεται στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού, την έκλυση νοραδρεναλίνης και τη λιπόλυση στις λιπιδικές αποθήκες, γεγονότα που αναστέλλονται με τη χορήγηση β-αδρενεργικών αναστολέων. Οι χρόνιοι αλκοολικοί, εμφανίζουν ελαττωμένη απομάκρυνση των λιπιδίων από το αίμα, που οφείλεται στην περιορισμένη δράση του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση. Η λιπώδης διήθηση του ήπατος που εμφανίζεται στους αλκοολικούς, αποδίδεται στην αυξημένη κινητοποίηση του λίπους των λιποαποθηκών, σε αυξημένη εστεροποίηση προς σχηματισμό τριγλυκεριδίων, αντί φωσφολιπιδίων ή εστέρων χοληστερόλης και σε ελάττωση της εξόδου τριγλυκεριδίων από το ηπατοκύτταρο.

Η κλινική εικόνα και η συμπτωματολογία που συνεπάγεται τη λήψη αιθανόλης, σχετίζονται με την ποσότητα που καταναλώθηκε, και κυρίως με τη στάθμη στο αίμα τη δεδομένη χρονική στιγμή. Όσο μεγαλύτερη είναι η στάθμη της αιθανόλης στο αίμα, τόσο σφοδρότερες και οι επιπτώσεις της στο ΚΝΣ. Σε συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 0,5 g/L, επικρατεί ψευδοδιέγερση και υποχωρούν οι αναστολές, ενώ το άτομο δε χαρακτηρίζεται υπό την επήρεια μέθης. Σε συγκεντρώσεις 0,5 – 1,5 g/L, επηρεάζονται οι σωματικές και πνευματικές λειτουργίες. Το άτομο γίνεται ευέξαπτο και ευερέθιστο, και πλέον βρίσκεται υπό την επήρεια αλκοόλ. Σε συγκεντρώσεις 1,5 – 2,5 g/L, το άτομο είναι μεθυσμένο. Παρατηρούνται οπτική και ακουστική εξασθένιση, διαταραχές στη μνήμη, την κρίση και την αντίληψη, ενώ οι μύες δεν συνεργάζονται. Ανάλογα με τον ψυχισμό του ατόμου, εκδηλώνονται συμπεριφορές ζωηρότητας, φαιδρότητας, φιλικότητας, συναισθηματικότητας, επιθετικότητας, κατάθλιψης, υπνηλίας ή νωθρότητας. Σε συγκεντρώσεις 2,5 – 3,5 g/L, οι σωματικές αντιδράσεις στα ερεθίσματα είναι μειωμένες, με αποτέλεσμα η όραση και η ακοή να έχουν σχεδόν ανασταλεί και ο πόνος να μην είναι αντιληπτός. Το άτομο παρουσιάζει ίλιγγο, αδυναμία στο βάδισμα και τη στήριξη, καθώς και αδυναμία αναγνώρισης γνωστών του προσώπων. Σε συγκεντρώσεις 3,5 – 4,0 g/L, επέρχονται η σταδιακή παράλυση και απώλεια συνείδησης, ενώ σε συγκεντρώσεις

άνω των 4,0 g/L, το άτομο πέφτει σε κώμα. Τα αντανακλαστικά έχουν σχεδόν εξαλειφθεί, η θερμοκρασία του σώματος έχει μειωθεί και δυσχεραίνει η αναπνοή. Στον παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται η κλινική εικόνα και η συμπτωματολογία σε σχέση με τα επίπεδα αιθανόλης στο αίμα.

Άτομα που χαρακτηρίζονται ως «συστηματικοί πότες», ανέχονται πολύ καλύτερα το αλκοόλ, από αυτά που δεν το καταναλώνουν συχνά. Η αντοχή αυτή, δεν μπορεί να εξηγηθεί επαρκώς από τις γνώσεις που έχουμε λάβει από τη φαρμακοκινητική της αιθανόλης. Ωστόσο, θεωρείται ότι τα άτομα αυτά έχουν μάθει να συμπεριφέρονται σωστά, και να εκτελούν τις καθημερινές τους λειτουργίες με αυξημένα επίπεδα αιθανόλης στο αίμα τους, τα οποία, υπό άλλες συνθήκες, θα αποδιοργάνωναν τη συμπεριφορά ενός ατόμου που απέχει από το αλκοόλ. Η ανοχή αυτή, χαρακτηρίζεται «φαινομενική» και δεν επεκτείνεται στα θανατηφόρα αποτελέσματα της αιθανόλης. Η τοξική συγκέντρωση της αιθανόλης ανέρχεται στα 550 mg/100 mL αίματος, και είναι ικανή να αποβεί μοιραία, ακόμη και για χρόνιους αλκοολικούς.

Πίνακας 2. Συσχέτιση της συμπτωματολογίας και της κλινικής εικόνας με τα επίπεδα αιθανόλης στο αίμα. (Μιχαλοδημητράκης, 2001)

Επίπεδο αιθανόλης στο αίμα (g/L)	Εικόνα
Έως 0,5	Νηφαλιότητα και ευφορία
0,5 – 1,5	Ευθυμία – ελαφρά μέθη – ανικανότητα σωστής οδήγησης
1,5 – 2,5	Μέθη – διαταραγμένη κινητικότητα και αντίληψη
2,5 – 3,5	Βαριά μέθη – το άτομο παραπαίει
3,5 – 4,0	Αποδιοργάνωση κινήσεων – Καταστολή αντανακλαστικών
> 4,0	Κώμα, θάνατος

1.4 Ενδογενής Αλκοολογένεση

Το «auto-brewery» syndrome, που είναι επίσης γνωστό ως σύνδρομο ζύμωσης εντέρου, ενδογενής αλκοολογένεση ή νόσος μέθης, είναι μια σπάνια ιατρική κατάσταση στην οποία παράγονται σημαντικές ποσότητες αιθανόλης μέσω της ενδογενούς ζύμωσης υδατανθράκων στο πεπτικό σύστημα, ικανές να προκαλέσουν συμπτώματα μέθης. Έχει ήδη περιγραφεί σε παιδιά και ενήλικες και των δύο φύλων (Kaji et al., 1984). Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, κοινώς η μαγιά μύρας, γνωστή για τη χρήση της στην παραγωγή ψωμιού και αλκοολούχων ποτών, λαμβάνεται από ορισμένους ανθρώπους ως προβιοτικό συμπλήρωμα, και έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας αυτής της πάθησης. Ωστόσο, αρκετοί άλλοι μικροοργανισμοί έχουν εντοπιστεί ως ύποπτοι, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων (Bayoumy et al., 2021). Πράγματι, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η *Klebsiella pneumoniae* μπορεί με παρόμοιο τρόπο να ζυμώνει υδατάνθρακες σε αλκοόλ στο έντερο, γεγονός που μπορεί να επιταχύνει τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Το auto-brewery syndrome έχει κυρίως περιγραφεί ότι εμφανίζεται σε ασθενείς με σύνδρομο βραχέος εντέρου μετά από χειρουργική εκτομή, που απαιτείται στο πλαίσιο της νόσου του Crohn στους ενήλικες και της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε μικρά παιδιά (Pironi, 2016). Η έλλειψη λειτουργικού λεπτού εντέρου μπορεί να προδιαθέσει τους ασθενείς σε ζύμωση δυσαπορροφημένων υδατανθράκων και συμπτώματα όπως διάρροια, που μπορεί να οδηγήσει σε αφυδάτωση, υποσιτισμό, απώλεια βάρους, φούσκωμα, καούρα, ναυτία, έμετο, κοιλιακή δυσφορία, κόπωση και δυσανεξία στη λακτόζη (Dinis-Oliveira, 2021).

Από δικαστικής άποψης, το εν λόγω σύνδρομο έχει αναφερθεί ότι είναι η αιτία της ενδογενούς παραγωγής αιθανόλης ως άμυνα έναντι των χρεώσεων οδήγησης υπό την επήρεια μέθης, αλλά αυτή η μεταβολική διαταραχή απέχει πολύ από το να διευκρινιστεί και οι δικαστές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι αυτή η κατάσταση μπορεί να απαιτεί διαφορετική δικαστική απόφαση. Ως εκ τούτου, ως προληπτικό μέτρο, οι γιατροί συνιστούν στους ασθενείς αυτούς να είναι πολύ προσεκτικοί κατά την οδήγηση μηχανοκίνητου οχήματος (B. K. Logan & Jones, 2000). Επιπλέον, αυτό το σύνδρομο μπορεί να έχει επιπτώσεις σε προγράμματα που ελέγχουν τα ούρα για αλκοόλ, συμπεριλαμβανομένων των προγραμμάτων θεραπείας εθισμού και μεταμοσχεύσεων. Με στόχο την ειδοποίηση των κλινικών γιατρών, περιγράφηκε ένα μη αναγνωρισμένο προηγούμενος ABS, στο οποίο παρήχθη αιθανόλη μέσω ενδογενούς ζύμωσης στο ουροποιητικό σύστημα (Kruckenberg et al., 2020).

Οι ειδικοί που ασχολούνται με τη δηλητηρίαση από αιθανόλη σε κλινικά και δικαστικά περιστατικά, θα πρέπει να έχουν κατά νου ότι το «auto-brewery syndrome» είναι πιθανότατα

μια υποδιαγνωσμένη κατάσταση. Υπό κανονικές συνθήκες, και με λίγες εξαιρέσεις, τα BACs που αναφέρονται στο περιφερικό φλεβικό αίμα είναι εξαιρετικά μικρά και επομένως στερούνται κλινικής ή ιατροδικαστικής σημασίας. Μια μεγάλη μελέτη από τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα διαπίστωσε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC/MS) στο headspace ότι σε 1557 συμμετέχοντες διαφορετικών εθνικοτήτων, ηλικιών και φύλων, το διάμεσο επίπεδο ενδογενούς αιθανόλης (δηλαδή, φυσιολογική αιθανόλη στο αίμα) ήταν 0,00113 g/L (Al-Awadhi et al., 2004). Τα μέγιστα BAC που αναφέρθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν 0,0352 και 0,0320 g/L σε άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα. Άλλες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η συγκέντρωση ενδογενούς αιθανόλης στο περιφερικό φλεβικό αίμα υγιών ατόμων, καθώς και εκείνων που πάσχουν από διάφορες μεταβολικές διαταραχές (π.χ. διαβήτη, ηπατίτιδα και κίρρωση), κυμαίνεται από 0 έως 0,0008 g/L (B. K. Logan & Jones, 2000). Η μελέτη, η οποία διεξήχθη για τον καθορισμό των επιπέδων αιθανόλης στο γαστρεντερικό για την παροχή συμβουλών σχετικά με τα νόμιμα όρια, αποκάλυψε μια μέση ενδογενή BAC 0,0014 g/L, με μέγιστο 0,0153 g/L και 0,0141 g/L σε άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα, όλα μακριά από το σημείο αποκοπής θετικών επιπέδων αιθανόλης που σχετίζονται με εγκληματολογικά ζητήματα. Πράγματι, οποιαδήποτε ενδογενής αιθανόλη που παράγεται από μικροβιολογική δραστηριότητα στο έντερο καθαρίζεται αποτελεσματικά όταν το αίμα της πυλαίας φλέβας διέρχεται από το ήπαρ για πρώτη φορά (Dinis-Oliveira, 2021).

1.5 Μεταθανάτια Παραγωγή Αιθανόλης

Η πρώτη επίσημη καταγραφή της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης φέρεται να πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του 1950 (O'Neal & Poklis, 1996). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της, δεν ήταν ιδιαίτερα ακριβής, με αποτέλεσμα να γίνεται μια προσεγγιστική μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης.

Μετά θάνατον, μια μεγάλη ποικιλία βακτηρίων, μυκήτων και ζυμομυκήτων μπορεί να παράγει αιθανόλη, τόσο στο σώμα, όσο και *in vitro*, με το *Escherichia coli* να αναφέρεται ότι συνεισφέρει τα μέγιστα (R. L. Hanzlick, 2014). Αυτή η παρατήρηση είναι σχετική, διότι το *E. coli* παρίσταται στη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου και μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στο αίμα και στους ιστούς μεταθανάτια. Σημαντικότερα υποστρώματα των εν λόγω μικροοργανισμών αποτελούν η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και τα αμινοξέα. Σημειώνεται, δε, ότι πρωτίστως τα βακτήρια παράγουν αιθανόλη, και δευτερευόντως οι μύκητες. Στον

παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται οι κυριότεροι μικροοργανισμοί – παραγωγοί αιθανόλης (πιν.3).

Πίνακας 3. Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν αιθανόλη μεταθανάτια

Βακτήρια	Μύκητες
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Candida albicans</i> (και λοιπά είδη <i>Candida</i>)
enterobacteria (ειδικότερα, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> και <i>Proteus species</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces species</i>)
micrococcaceae (κυρίως <i>Staphylococcus aureus</i>)	
streptococci (κυρίως <i>Streptococcus faecalis</i> και μη αιμολυτικά streptococci)	
<i>Bacillus species</i> (κυρίως <i>Bacillus subtilis</i>)	

Ορισμένοι ερευνητές υποθέτουν πως τα ούρα δεν αποτελούν εύφορο έδαφος για την μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης. Ακόμη, τονίζουν ότι ένα αρνητικό αποτέλεσμα για αιθανόλη στα ούρα, με θετικό αποτέλεσμα στο μεταθανάτιο αίμα, θα μπορούσε να είναι ένδειξη της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης. Έτσι, ο προσδιορισμός της αιθανόλης στα ούρα, θα μπορούσε να είναι κατατοπιστικός.

Πιθανής συνάφειας είναι προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι δεν παράγεται αιθανόλη όταν τα σώματα ψύχονταν εντός τεσσάρων ωρών από τον θάνατο, ακόμη και αν βακτήρια ήταν παρόντα στο αίμα, και ότι το σώμα πρέπει να βρίσκεται στους 5 °C για τουλάχιστον τέσσερις ώρες, ώστε να παρατηρηθεί παραγωγή αιθανόλης (Drummer, 2014). Έτσι, η ανησυχία για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης δεν θα ήταν μεγάλη σε σώματα που αποθηκεύονται αμέσως στο ψυγείο ή σε θανάτους που συμβαίνουν σε άλλες πολύ ψυχρές

συνθήκες. Η σημασία της έγκαιρης ψύξης των δειγμάτων είναι επίσης προφανής. Παλαιότερες μελέτες για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης *in vivo* μπορούν να αμφισβητηθούν επειδή οι μέθοδοι δοκιμής μπορεί να μην ήταν ειδικές για την αιθανόλη και τα δείγματα μπορεί να μην είχαν συντηρητικά - μια κατάσταση που μπορεί να αποφευχθεί με τα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται σήμερα, όπως το φθοριούχο νάτριο (NaF).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό των περιπτώσεων με πιθανή μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης ποικίλλει ανάλογα με την κατάσταση του σώματος και μπορεί να φτάσει τα 22 mg/dL (0,22 g/L) σε σώματα που εμφανίζουν προχωρημένη σήψη (Gilliland & Bost, 1993). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση αιθανόλης ήταν μικρότερη από 70 mg/dL (0,7 g/L), αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις φέρεται να έφτανε τα 220 mg/dL (2,2 g/L) (R. Hanzlick, 2009). Τέτοιες υψηλές συγκεντρώσεις δεν αναμένεται να προκαλέσουν σύγχυση σχετικά με τη διάγνωση της οξείας δηλητηρίασης με αιθανόλη, επειδή συγκεντρώσεις αιθανόλης τουλάχιστον 350-400 mg/dL (3,5 – 4 g/L) ή υψηλότερες συνήθως εμπλέκονται σε οξεία θανάτους από δηλητηρίαση από αιθανόλη. Η κύρια ερμηνευτική δυσκολία θα σχετίζεται περισσότερο με την αξιολόγηση του επιπέδου βλάβης ενός αποθανόντος τη στιγμή των μοιραίων γεγονότων (R. L. Hanzlick, 2014).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει εμφανείς αυξήσεις στη συγκέντρωση αιθανόλης μεταθανάτια στο αίμα και τα ούρα διαβητικών με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα ή τα ούρα, ή σε άτομα που έλαβαν ενδοφλέβια γλυκόζη, λόγω μικροβίων και ειδικά εάν υπάρχει μύκητας όπως η *Candida* (V. A. Boumba et al., 2013) (V. A. Boumba, 2022). Επισημαίνεται, σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανάγκη διατήρησης των ούρων με φθοριούχο νάτριο όπως γίνεται με το αίμα. Άλλοι έχουν υποθέσει ότι η αιθανόλη μπορεί να διαχέεται στην ουροδόχο κύστη από την παραγωγή αιθανόλης στην κοιλιακή κοιλότητα.

Δοκιμές για άλλες ουσίες έχουν γίνει από ορισμένους σε μια προσπάθεια τεκμηρίωσης της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ανίχνευση ανώτερων αλκοολών όπως η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη μπορεί να είναι χρήσιμη, καθώς παράγονται από μικρόβια. Σημειώνεται ότι ακόμη και αν δεν είναι παρούσα η 1-προπανόλη, ενώ είναι η 1-βουτανόλη, τότε αυτό αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης (Velivasi, Sakkas, et al., 2021b). Άλλοι έχουν προτείνει ότι η ανίχνευση του αιθυλογλυκουρονιδίου (EtG) υποδεικνύει την προθανάτια κατανάλωση επειδή είναι μεταβολίτης της αιθανόλης και απαιτεί λειτουργικό ήπαρ και κυκλοφορία για να εμφανιστεί στο αίμα (Appenzeller et al., 2008). Άλλοι βασίστηκαν στην αναλογία των μεταβολιτών της

σεροτονίνης στα ούρα για να κάνουν τέτοιες διακρίσεις. Η 5-υδροξυ-τροπτοφόλη (5-HTOL) και το 5-υδροξυ-ινδολο-3-οξικό οξύ (5-HIAA) είναι μεταβολίτες της σεροτονίνης. Το 5-HIAA είναι συνήθως ο κύριος μεταβολίτης της σεροτονίνης, αλλά όταν υπάρχει αιθανόλη, σχηματίζεται αυξημένη 5-HTOL, προκαλώντας αύξηση της αναλογίας 5-HTOL/5-HIAA αρκετές φορές υψηλότερη από την κανονική αναλογία $< 0,01$ (Helander et al., 1995).

Το μη συντηρημένο αίμα και οι ιστοί (ήπαρ, μύες, νεφροί) από πτώματα αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και δοκιμάστηκαν για αιθανόλη σε διαφορετικούς χρόνους σε μια περίοδο οκτώ ημερών (Helander et al., 1995). Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 20°C και 4°C δεν έδειξαν καμία αύξηση στη συγκέντρωση αιθανόλης με την πάροδο του χρόνου, αλλά το αίμα παρουσίασε στατιστικά σημαντικές αυξήσεις όταν αποθηκεύτηκε στους 30°C. Σε μια άλλη μελέτη, φάνηκε ότι το μη συντηρημένο αίμα που αποθηκεύτηκε στους 4°C για 96 ώρες παρουσίασε αυξήσεις στη συγκέντρωση αιθανόλης που κυμαίνονταν από 22 έως 75 mg/dL και στους 25°C, αυξήσεις κυμαίνονταν από 19 έως 84 mg/dL. Το φθοριούχο νάτριο απέτρεψε τέτοιες αυξήσεις και στις δύο ομάδες περιπτώσεων (Lewis et al., 2004a).

Η μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης μεταθανάτια είναι λιγότερο ανησυχητική από τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης, αν και μπορεί να συμβεί. Η μεγάλη ποσότητα αέρα που είχε αποθηκευτεί στο δοχείο του δείγματος έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης στα εγκληματολογικά δείγματα. Τέλος, πρέπει να θυμόμαστε περιστάσεις που μπορούν να προκαλέσουν σφάλματα στις συγκεντρώσεις αιθανόλης. Οι λεγόμενοι «τυφλοί σωλήνες» μέσω του θωρακικού τοιχώματος μπορεί να οδηγήσουν σε αναρρόφηση αιθανόλης από τον οισοφάγο, η αιθανόλη μπορεί να διαχέεται από το στομάχι ή το λεπτό έντερο (ειδικά έπειτα από ρήξη στομάχου ή διαφραγματική κήλη) στο αίμα και η ενδοκοιλιακή αιθανόλη μπορεί να διαχέεται στην ουροδόχο κύστη ως σημειώθηκε προηγουμένως (Fisher et al., 2006). Το βασικό σημείο είναι ότι όταν είναι δυνατόν, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από περιφερειακά σημεία όπως τα μηριαία αγγεία.

1.6 Μικροβιακές Ζυμώσεις της Αιθανόλης

Κατά τις εξεργασίες της σήψης, οι μαλακοί ιστοί διασπώνται, και αλλοιώνονται τα πρωτεϊνικά, λιπιδικά και υδατανθρακικά συστατικά τους. Πολυάριθμα είναι τα ένζυμα που συμμετέχουν, και είναι πιθανό να βρίσκονται είτε σε ενεργό, είτε σε λανθάνοντα τύπο ιστού. Εναλλακτικά, προέρχονται από βακτήρια και μύκητες, του εντέρου ή του εξωτερικού περιβάλλοντος, είτε από έντομα. Εξάλλου, σύντομα μετά το θάνατο, παρατηρείται η

μετανάστευση των μικροοργανισμών από τα έντερα σε κοντινούς ιστούς. Η πρόσβαση τους παρέχεται μέσω των λεμφικών, των τριχοειδών αγγείων και των φλεβών. Η διαδικασία αυτή επιταχύνεται ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με αυξημένη θερμοκρασία (Ziανρου et al., 2005).

Οι μικροοργανισμοί που εκτελούν την αποικοδόμηση, μπορούν να είναι αερόβιοι και αναερόβιοι. Πρώτοι εκτελούν το έργο τους οι αερόβιοι οργανισμοί, εξαντλώντας το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (O_2) από τους ιστούς, και δημιουργώντας εύφορο έδαφος για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι τελευταίοι είναι περισσότερο καταστροφικοί. Φυσικά, η μείωση των επιπέδων οξυγόνου, οδηγεί στη σταδιακή μείωση, και εξαφάνιση του αερόβιου πληθυσμού. Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί προέρχονται από τον εντερικό σωλήνα. Σε μεταγενέστερα στάδια της σήψης, παρατηρούνται και αναερόβιοι μικροοργανισμοί από το έδαφος και τον αέρα. Συνοπτικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αμέσως μετά το θάνατο, σταματά η παροχή οξυγόνου στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά το pH, και δημιουργείται ένα αναερόβιο περιβάλλον. Οι συνθήκες είναι κατάλληλες για ζύμωση (Ziανρου et al., 2005).

Γενικά, τα μικρόβια έχουν αναπτύξει μια ποικιλία συντονισμένων και προσαρμοστικών μηχανισμών και ρυθμιστικών κυκλωμάτων, έτσι ώστε να προσαρμόζουν τη φυσιολογία τους στο περιβάλλον που αποικούν. Αυτή η προσαρμογή προωθείται από ειδική για το υπόστρωμα επαγωγή ή καταστολή των καταβολικών γονιδίων. Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού, και το μεταβολισμό τους, είναι η διαθεσιμότητα του υποστρώματος. Ακόμη, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και η ύπαρξη επαρκών ανόργανων ενώσεων που δρουν σαν ηλεκτρονιοδότες, και συμβάλλουν στο μεταβολισμό τους. Τέτοιες ενώσεις είναι τα νιτρικά και τα θειϊκά άλατα. Ακόμη, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί του καταβολισμού των μικροοργανισμών, θα πρέπει να λειτουργούν σωστά και αδιάκοπα. Τέλος, οι ανταγωνιστικές και συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών στη μικροχλωρίδα, μπορούν να διαταράξουν τη δράση τους.

Κατά τις διεργασίες των ζυμώσεων, σε αναερόβιες συνθήκες, τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), αντί για το μοριακό οξυγόνο (O_2) ή άλλα ανόργανα ανιόντα. Ακόμη, δε χρησιμοποιείται κάποια αλυσίδα μεταφορά ηλεκτρονίων ώστε να οξειδωθεί το NADH σε NAD^+ . Στην πραγματικότητα, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί συνήθως αποφεύγουν την αξιοποίηση ολόκληρου του κύκλου του KREBS, ούτως ώστε να κάνουν οικονομία στο NADH. Τα ανηγμένα προϊόντα του αναερόβιου μεταβολισμού είναι το υδρογόνο, το γαλακτικό, το ηλεκτρικό και το βουτυρικό οξύ, καθώς και η αιθανόλη. Τα

προϊόντα αυτά διατηρούν την οξειδοαναγωγική ισορροπία, κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Αντίθετα, προϊόντα οξείδωσης, όπως το οξικό ανιόν, συνδέονται με την παραγωγή ATP.

Οι υδατάνθρακες και ιδιαίτερα οι εξόζες, όπως η γλυκόζη, είναι οι προτιμώμενες πηγές άνθρακα και ενέργειας για πολλά μικρόβια. Τα μικρόβια διαθέτουν δύο μηχανισμούς για τον καταβολισμό των υδατανθράκων: τη γλυκολυτική οδό Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) και την οδό Entner–Doudoroff (ED). Το τελικό προϊόν αυτών των γλυκολυτικών διεργασιών είναι το πυροσταφυλικό. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη οδός για την πρόσληψη γλυκόζης και τη μετατροπή σε πυροσταφυλικό είναι η γλυκολυτική οδός EMP (V. A. Boumba et al., 2008). Αυτό συμβαίνει σε ζώα, φυτά, πολλά βακτήρια και ζυμομύκητες. Το άθροισμα των αντιδράσεων που δημιουργούν δύο μόρια πυροσταφυλικού και ATP ανά μόριο γλυκόζης είναι το εξής: (όπου Pi: ανόργανο ορθοφωσφορικό)



1.6.1 Αλκοολική ζύμωση από μύκητες και βακτήρια

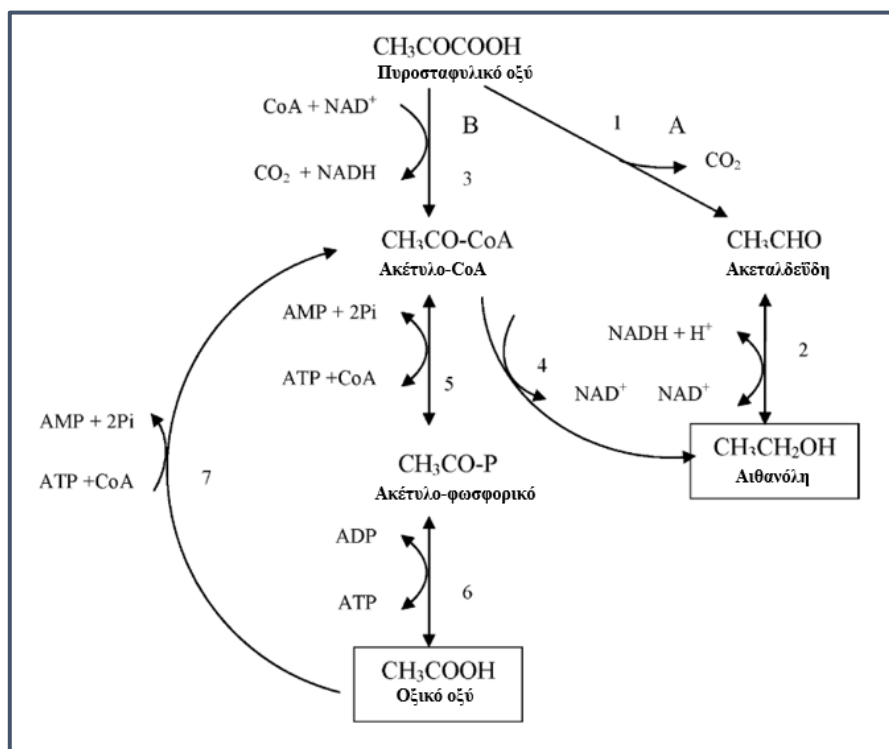
Οι μύκητες που συνεισφέρουν περισσότερο στην αλκοολική ζύμωση είναι αυτοί που ανήκουν στα είδη *S. cerevisiae*. Από τα βακτήρια, είναι τα είδη *Zygomonas*, που ακολουθούν το ED βιοχημικό μονοπάτι, καθώς και οι *Zygomonas mobilis*, *Zygomonas anaerobica*, *Sarcina ventriculi* και *Erminia amylovora*, που ακολουθούν το EMP βιοχημικό μονοπάτι. Τα ένζυμα που επιδρούν είναι η αλκοολική αφυδρογονάση και η αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού.

Όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω βιοχημικό μονοπάτι, στους μύκητες, και σε κάποια είδη βακτηρίων, το πυροσταφυλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται από την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, σχηματίζοντας ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια, με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης, μετατρέπεται σε αιθανόλη, με παράλληλη παραγωγή NAD^+ (αναγωγική ενέργεια). Αυτό πρόκειται για το Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) γλυκολυτικό μονοπάτι.

Ωστόσο, η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, συναντάται σπάνια στα βακτήρια (R. S. Wolfe & Wiegel, 1980). Έτσι, η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο-CoA, πραγματοποιείται από τη λύση του πυροσταφυλικού-φορμικού, αν η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση δεν είναι παρούσα. Στη συνέχεια, και με την παραγωγή ενός μορίου ATP,

το ακετυλο-CoA φωσφορυλιώνεται, από φωσφοτρανσακετυλάση, και τέλος, παράγεται οξικό οξύ, από την κινάση του οξικού οξέος. Από την τελευταία αντίδραση, παράγεται ακόμη ένα μόριο ATP. Η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA μπορεί να συμβεί οξειδωτικά υπό αερόβιες συνθήκες και μη οξειδωτικά υπό αναερόβιες συνθήκες. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση καταλύεται από το σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Η μη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA και μυρμηκικό καταλύεται από το σύστημα λύασης του πυροσταφυλικού-μυρμηκικού.

Το ακετυλο-CoA, έχει δύο επιλογές μετασχηματισμού. Η δεύτερη επιλογή, αφορά στην αναγωγή της σε αιθανόλη, η οποία καταλύεται από την ακεταλδεϋδική/αλκοολική αφυδρογονάση, μέσω του σχηματισμού ακεταλδεϋδης, και καταναλώνει αναγωγικά ισοδύναμα (A. J. Wolfe, 2005). Επομένως, τα βακτήρια μπορούν να εξισορροπήσουν τις απαιτήσεις τους για μείωση των νουκλεοτιδίων και της ενέργειας ρυθμίζοντας την ποσότητα αιθανόλης και οξικού που σχηματίζεται. Η παραγωγή αιθανόλης μέσω ακετυλο-CoA έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαφόρων άλλων παραπροϊόντων. Στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, ακολουθείται το μονοπάτι Entner – Doudoroff (ED).



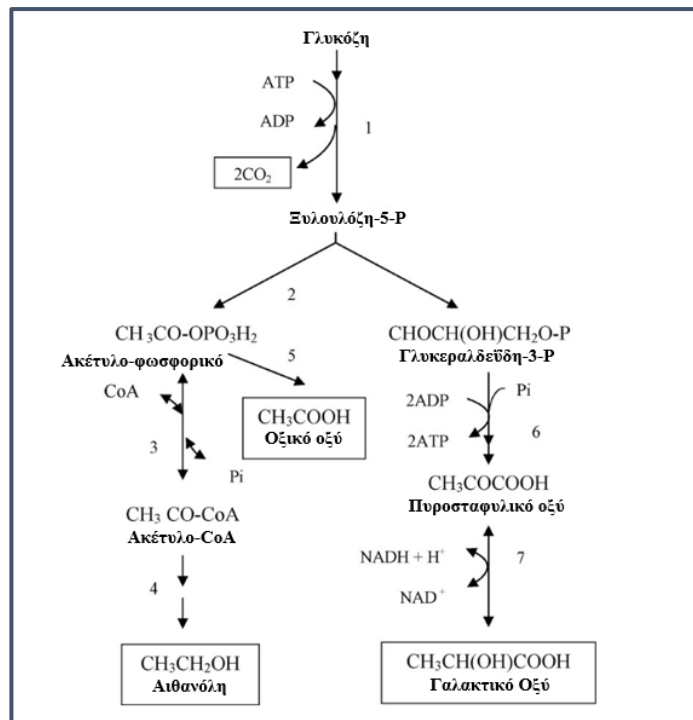
Σχήμα 6. Αλκοολική ζύμωση από μύκητες (A) και βακτήρια (B) (V. A. Boumba et al., 2008)

1.6.2 Γαλακτική ζύμωση

Ορισμένα βακτηριακά γένη, τα οποία αποκαλούνται ευρύτερα στη βιβλιογραφία οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB), παράγουν σαν κύριο τελικό μεταβολικό προϊόν, το γαλακτικό οξύ. Το υπόστρωμα που αξιοποιούν είναι υδρογονανθρακικής φύσης. Είναι προαιρετικά αναερόβια και έχουν περιορισμένη βιοσυνθετική ικανότητα. Τα γένη που περιλαμβάνουν είναι οι *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* και *Enterococcus*. Τα βιοχημικά μονοπάτια που ακολουθούνται, είναι δύο, με το πρώτο να αναφέρεται στα ομοζυμωτικά και το δεύτερο στα ετεροζυμωτικά βακτήρια. Εν γένει, το γαλακτικό οξύ θα μπορούσε να θεωρηθεί σημαντικό υπόστρωμα για την μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης, διότι η γαλακτική αφυδρογονάση και το γαλακτικό οξύ βρίσκονται στους ιστούς των ανθρώπων.

Πρώτο στάδιο, αποτελεί η μετατροπή της γλυκόζης σε ξυλουλόζη-5-P. Σε αυτό το στάδιο γίνεται ο διαχωρισμός, για το ποια μεταβολική οδός θα αξιοποιηθεί. Η πρώτη οδηγεί στην παραγωγή πυρσοταφυλικού οξέος, μέσω του μονοπατιού EMP, το οποίο αργότερα ανάγεται σε γαλακτικό οξύ, από τη γαλακτική αφυδρογονάση. Η δεύτερη μεταβολική οδός, μετατρέπει την ξυλουλόζη-5-P σε ακετυλο-φωσφορικό (ακέτυλο-P), μέσω της φωσφοκετολάσης. Το ακέτυλο-P, μπορεί να μετατραπεί απευθείας σε οξικό οξύ, από την αλκοολική αφυδρογονάση, ή σε ακέτυλο-CoA, και τέλος σε αιθανόλη, από τα διαδοχικά ένζυμα φωσφοτρανσακετυλάση και αλκοολική αφυδρογονάση.

Το οξικό οξύ θα μπορούσε να μετατραπεί μέσω της δράσης της οξικής κινάσης ή της συνθετάσης του ακετυλο-CoA σε ακετυλο-CoA προκαλώντας σχηματισμό αιθανόλης ή θα μπορούσε να συσσωρευτεί στο μέσο (A. J. Wolfe, 2005). Η μοίρα του προπιονικού από τα προπιονικά βακτήρια θα μπορούσε να δημιουργήσει 1-προπανόλη (Wood, 1981).



Σχήμα 7. Γαλακτική ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (V. A. Boumba et al., 2008)

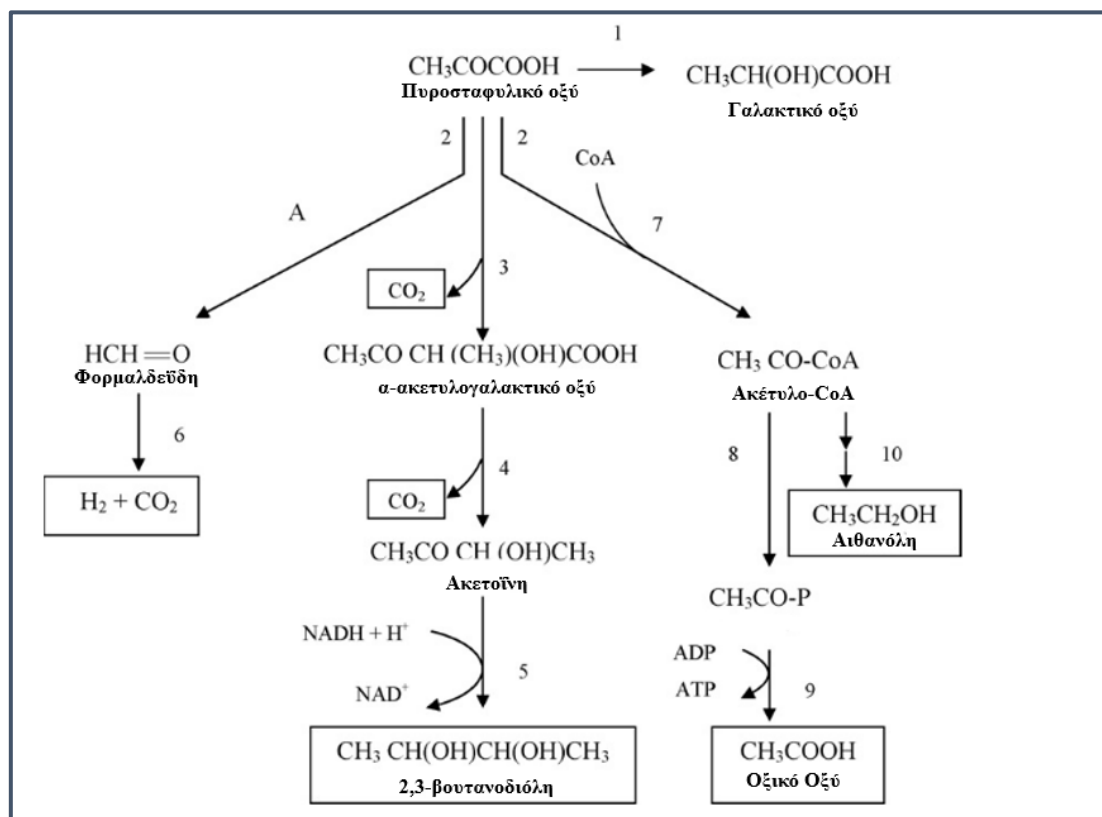
1.6.2 Ζύμωση της 1-βουτανιοδιόλης και του Μίγματος Οξέων

Η ζύμωση της 1-βουτανιοδιόλης εκτελείται κυρίως από τα εντεροβακτήρια. Τα είδη που ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Salmonella* και *Shigella*, μεταβολίζουν τα σάκχαρα, δημιουργώντας ένα μίγμα προϊόντων, που αποτελείται γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και φορμικό οξύ. Ακόμη, παράγονται αέριο υδρογόνο (H_2) και διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη. Τα είδη που ανήκουν στα γένη *Enterobacter*, *Serratia* και *Erwinia*, παράγουν λιγότερα οξέα, περισσότερα αέρια και αιθανόλη, καθώς και σημαντικές ποσότητες 2,3-βουτανιοδιόλης (Syu, 2001).

Τα εντεροβακτήρια χρησιμοποιούν, επίσης, το μονοπάτι EMP για τη διάσπαση της εξόζης. Το ηλεκτρικό προκύπτει από τη φωσφοενολοπυροσταφυλική, την πρόδρομη ένωση του πυροσταφυλικού. Όλα τα άλλα τελικά ζυμωτικά προϊόντα (πλην του ηλεκτρικού) προέρχονται από πυροσταφυλικό. Στη ζύμωση του μίγματος οξέων, σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες γαλακτικού με τη δράση της LDH. Μόνο μικρή ποσότητα γαλακτικού παράγεται κατά τη ζύμωση της βουτανιοδιόλης. Η αναλογία των προϊόντων ζύμωσης που σχηματίζονται εξαρτάται από τη δραστηριότητα των συστημάτων τριών ενζύμων που θα μπορούσαν να δράσουν στο πυροσταφυλικό. Το πρώτο ένζυμο είναι η γαλακτική αφυδρογονάση, υπεύθυνη για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ (Garvie, 1980). Το δεύτερο ένζυμο

είναι το σύστημα πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης που παράγει μυρμηκικό οξύ και ακετυλο-CoA (Bagramyan & Trchounian, 2003). Το τρίτο είναι η συνθάση του ακετυλογαλακτικού που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ακετογαλακτικό οξύ (Chirpman et al., 2005).

Τα εντεροβακτήρια διαθέτουν δύο ενζυμικά συστήματα για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-CoA. Το πρώτο είναι το πολυενζυμικό σύμπλεγμα πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης το οποίο εμπλέκεται στον αερόβιο μεταβολισμό και δημιουργεί δύο επιπλέον NADH ανά γλυκόζη ενώ το NADH αναστέλλει τη δραστηριότητά του. Υπό αναερόβιες συνθήκες, το ένζυμο που υπάρχει αναστέλλεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις NADH που δεν μπορεί να αποοξειδωθεί σε NAD⁺ και επιπλέον, δεν συντίθεται πλέον. Αντίθετα, υπό αναερόβιες συνθήκες, προκαλείται η σύνθεση της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης. Το πλεονέκτημα της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης έναντι του συμπλόκου πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης στον ζυμωτικό μεταβολισμό είναι ότι ο σχηματισμός ακετυλο-CoA δεν συνοδεύεται από την αναγωγή του NAD⁺ (A. J. Wolfe, 2005).



Σχήμα 8. Ζύμωση προς μίγμα οξέων και 2,3-βουτανολιόλης, που πραγματοποιείται από τα εντεροβακτήρια (V. A. Boumba et al., 2008)

1.6.3 Ζυμώσεις των Αμινοξέων

Τα αμινοξέα ως υπόστρωμα μικροβιακής ανάπτυξης δημιουργούν τις πτητικές ενώσεις που θα μπορούσαν να βρεθούν στη βιβλιογραφία με την ονομασία ανώτερες αλκοόλες (higher alcohols). Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για να ορίσει κυρίως τις πτητικές ενώσεις 1-προπανόλη, 2-μεθυλ-προπανόλη (ισοβουτυλική αλκοόλη), 2-μεθυλ-1-βουτανόλη (δραστική ή δ-αμυλική αλκοόλη) και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη (ισοαμυλ-αλκοόλη). Το μείγμα αυτών των αλκοολών αναφέρεται επίσης ως αμυλόπνευμα (fusel alcohol), καθώς είναι τα κύρια συστατικά του πετρελαίου που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση από μεταβλητούς μικροοργανισμούς. Επιπλέον, ο όρος «αλκοόλες διακλαδισμένης αλυσίδας» χρησιμοποιείται για τον ορισμό της ισοβουτανόλης, ισοαμυλικής και d-αμυλικής αλκοόλης, καθώς προέρχονται από τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, αντίστοιχα.

Για την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών, ενδιάμεσες ενώσεις – κλειδιά θεωρούνται τα α-κετοξέα. Η προέλευσή τους είναι είτε καταβολικά από εξωγενή αμινοξέα, μέσω του βιοχημικού μονοπατιού “Ehrlich”, είτε αναβολικά από τα ανάλογα βιοσυνθετικά μονοπάτια των αμινοξέων. Η είσοδος στο αντίστοιχο μονοπάτι, γίνεται με βάση τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων. Η σημασία της αναβολικής οδού μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στην αλκοόλη (Hazelwood et al., 2008) και αυξάνεται καθώς τα αμινοξέα εξαντλούνται (Willaert & Nedovic, 2006).

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται κυρίως από μύκητες, και ειδικότερα σε καλλιέργειες άγριου τύπου στελεχών *S. cerevisiae*. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα είναι η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη και η θρεονίνη, και μετατρέπονται σε d-αμυλική αλκοόλη, ισοβουτανόλη και 1-προπανόλη, αντίστοιχα, ενώ έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία τρία (3) βιοχημικά μονοπάτια (V. A. Boumba et al., 2008). Ακόμη, θεωρείται ότι και τα βακτήρια συμμετέχουν στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών, με μονοπάτια όμοια με αυτά που ακολουθούνται από τους μύκητες. Ο Janssen προτείνει ότι ένα είδος *Clostridium* παράγει 1-προπανόλη από θρεονίνη. Ακόμη, τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια παρουσιάζουν ομοιότητες στο μεταβολισμό τους με τα είδη *Zymomonas* (Janssen, 2004). Αυτά τα βακτήρια μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω της οδού ED και παρουσιάζουν μεγαλύτερες δυνατότητες από τους ζυμομύκητες που παράγουν αιθανόλη (ÅYräpää, 1968). Τα είδη *Zymomonas* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών που περιέχουν αρκετές αλκοόλες υψηλότερου μοριακού βάρους ως κύρια συστατικά τους, όπως 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και d-αμυλική αλκοόλη (Swings & De Ley, 1977).

Η φυσική σημασία της παραγωγής ανώτερων αλκοολών διαφαίνεται από δύο παρατηρήσεις: πρώτον ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης χρειάζεται για την παραγωγή τους και δεύτερον ότι η εμφάνιση του αμυλοπνεύματος (fusel alcohol) συνέπεσε με το σχηματισμό αιθανόλης (Gonzalez & Morales, 2017). Η εξήγηση που δόθηκε σε αυτή την πτυχή ήταν ότι παρουσία γλυκόζης, ήταν διαθέσιμα περισσότερα αναγωγικά συνένζυμα για τη σύνθεση ανώτερων αλκοολών από πρόδρομες ουσίες, παρόλο που είναι πιθανό μερικές από τις υψηλότερες αλκοόλες να παράγονταν από γλυκόζη. Υπάρχει ανταγωνισμός για το NADH, την αλκοολική αφυδρογονάση και την καρβοξυλάση, εξηγώντας έτσι την υστέρηση μεταξύ της εξαφάνισης των αμινοξέων και της εμφάνισης των υψηλότερων αλκοολών που παρατηρήθηκαν στις σχετικές μελέτες (V. A. Boumba et al., 2008). Ο αναγωγικός σχηματισμός των αλκοολών θα πρέπει να μπορεί να χρησιμεύσει ως μηχανισμός για την ανακύκλωση ανηγμένων συμπαραγόντων κατά τον καταβολισμό αμινοξέων. Επομένως, ο σχηματισμός υψηλότερης αλκοόλης, αν και ασυνήθιστος, έχει προταθεί ότι είναι ένας μηχανισμός για την απόρριψη ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αμινοξέων (Swings & De Ley, 1977)

Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό στοιχείο είναι ότι αν και το ποσοτικό μοτίβο του σχηματισμού ανώτερων αλκοολών είναι μεταβλητό, στις περισσότερες περιπτώσεις κυριαρχεί η 1-προπανόλη. Μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί σε αυτή την πτυχή είναι ότι η 1-προπανόλη θα μπορούσε να προέρχεται απευθείας από πηγές αμινοξέων (θρεονίνη) ανεξάρτητα από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων (που απαιτείται για τις άλλες ανώτερες αλκοόλες) και τη διαθεσιμότητα γλυκόζης στο μέσο. Μια άλλη πιθανότητα είναι ο σχηματισμός 1-προπανόλης από άλλες οδούς (μείον την «οδό Ehrlich») και υποστρώματα (μείον αμινοξέα). Στην πραγματικότητα, μια βαθύτερη εικόνα των μικροβιακών μεταβολικών οδών αποκάλυψε πιο σύνθετους μηχανισμούς για τον σχηματισμό 1-προπανόλης, ορισμένοι από τους οποίους δεν έχουν ακόμη εξηγηθεί πλήρως, όπως θα παρουσιαζόταν στην επόμενη ενότητα σχετικά με τη γλυκερίνη ως υπόστρωμα.

1.7 Μέθοδοι Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού της Αιθανόλης

Η αιθανόλη μετρίεται συνήθως στην αναπνοή από αστυνομικούς στο δρόμο με χρήση συσκευής χειρός και στο αίμα ή στα ούρα από επιστήμονες που χρησιμοποιούν αναλυτές υψηλής απόδοσης βασισμένους σε ανοσοδοκιμασίες ή αέρια χρωματογραφία headspace σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (HS-GC-FID).

Οι αναλυτές που βασίζονται σε ανοσοδοκιμασίες χρησιμοποιούνται για τη γρήγορη εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων για τον εντοπισμό πιθανών θετικών δειγμάτων και την εξάλειψη των αρνητικών. Αυτές οι δοκιμασίες διαλογής χρησιμοποιούνται από εργαστήρια που προσφέρουν δοκιμές φαρμάκων στο χώρο εργασίας, όπου η πλειονότητα των δειγμάτων θα είναι αρνητικά. Τα θετικά δείγματα πρέπει να επιβεβαιωθούν από το HS-GC-FID. Τα σύγχρονα εργαστήρια δικαστικής τοξικολογίας που προσφέρουν ανάλυση δικαστικών περιπτώσεων χρησιμοποιούν συστήματα HS-GC-FID για να διασφαλίσουν ακριβή, ισχυρή και νομικά υπερασπιστή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της αιθανόλης και των σχετικών πτητικών (Lewis et al., 2004b; O'Neal et al., 1996; Wigmore & Chow, 2000).

1.7.1 Αλκοτέστ

Η ανίχνευση της αιθανόλης στην αναπνοή, εφαρμόζεται από τους αστυνομικούς της τροχαίας, μέσω του αλκοτέστ. Πρόκειται για μια μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης της αιθανόλης στην αναπνοή, ή BrAC (Breath Alcohol Concentration), η οποία είναι επίσημα αποδεκτή από τα δικαστήρια και τη νομοθεσία. Τα όρια του αλκοτέστ, ορίζονται από την εκάστοτε χώρα. Στην Ελλάδα, και τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το κατώτερο αποδεκτό όριο για τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, ανέρχεται στα 0,5 g/L, ενώ στις ΗΠΑ, στα 0,8 g/L. Σε περιπτώσεις που αμφισβητείται το αποτέλεσμα του τεστ, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα (BAC), με μέθοδο που αναλύσουμε στη συνέχεια. Η σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στην αναπνοή με αυτή του αίματος για μια δεδομένη χρονική στιγμή, παρίσταται παρακάτω. Η παρακάτω εξίσωση δίνει μια περισσότερο αμερόληπτη τιμή BAC.

$$\text{BAC} = \text{BrAC} \times 2300$$

Εξίσωση 1. Σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης αιθανόλης της αναπνοής (BrAC) και του αίματος (BAC)

Η προέλευση του αλκοτέστ μπορεί να αναχθεί σε μια επιστημονική αρχή γνωστή ως νόμος του Henry, που πήρε το όνομά του από τον επιστήμονα J.W. Henry, που ανακάλυψε για πρώτη

φορά τις ιδιότητές του στις αρχές του 19ου αιώνα (Jaffré & Sboui, 2010). Ο νόμος του Henry δηλώνει ότι σε μια δεδομένη θερμοκρασία η ποσότητα, εκφρασμένη σε μάζα, ενός αερίου ή ατμού που διαλύεται σε έναν δεδομένο όγκο διαλύτη είναι ανάλογη με την πίεση αυτού του αερίου ή ατμού. Μεταγενέστερες εργασίες που έγιναν τον 20ο αιώνα έδειξε ότι το αλκοόλ διαλυμένο στο αίμα υπάκουε σε αυτή την αρχή, καθώς η κανονική θερμοκρασία του σώματος εκτείνεται σε ένα πολύ στενό εύρος, από 36,2 έως 37,4° C. Έτσι, η κανονική θερμοκρασία του σώματος γίνεται η «δεδομένη θερμοκρασία», το «αέριο ή ατμός» είναι ο ατμός αιθανόλης και ο «διαλύτης» είναι το κυκλοφορούν αίμα ενός ανθρώπου. Η αιθανόλη είναι αρκετά πτητική ως υγρό, όπως έχει αναφερθεί ξανά, γεγονός που σημαίνει ότι μπορεί να εξατμιστεί στον υπερκείμενο χώρο πάνω από το υγρό ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η μεταβλητότητα εξαρτάται από τη θερμοκρασία: όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερη είναι η εξάτμιση. Επειδή η εξάτμιση μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία, η διατήρηση μιας σταθερής δεδομένης θερμοκρασίας είναι απαραίτητη για τη μέτρηση του επιπέδου αλκοόλ στο αίμα μέσω του αλκοτέστ (Hodgson, 2008).

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για αυτόν το σκοπό, διαθέτουν σαν αρχή λειτουργίας την οξειδοαναγωγή της εκπνεόμενης αιθανόλης. Στην πλειοψηφία τους, οι ανιχνευτές είναι ηλεκτροχημικής φύσης, με κελί καυσίμου (fuel cell). Απαρτίζονται από δυο ηλεκτρόδια λευκοχρύσου, τα οποία περιβάλλονται από μια πολυμερική ηλεκτρολυτική μεμβράνη. Κατά τη διενέργεια του ελέγχου, η αιθανόλη που περιέχεται στον εκπνεόμενο αέρα, διέρχεται από το ηλεκτρόδιο της ανόδου, όπου λαμβάνει χώρα η οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Τα πρωτόνια που απελευθερώνονται, περνούν στην μεμβράνη, ενώ τα ηλεκτρόνια, μεταφέρονται μέσω εξωτερικού κυκλώματος, στην κάθοδο. Εκεί, με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, δημιουργούν μόρια νερού. Το φορτίο που παράγεται, από τη ροή των ηλεκτρονίων, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπέστη οξείδωση στην άνοδο (Rahman et al., 2016).

Η μέθοδος αυτή είναι μη-επεμβατική, γεγονός που αποτελεί το σημαντικότερο πλεονέκτημά της. Ωστόσο, η ακρίβεια της χρήζει συζήτησης. Από τα συχνότερα σφάλματα που παρατηρούνται και έχουν σαν αποτέλεσμα τη λήψη ψευδώς αυξημένων τιμών, είναι η χρήση αντισηπτικού διαλύματος με βάση την αιθανόλη, από τους υπεύθυνους αστυνομικούς, και η κακή συντήρηση και βαθμονόμηση των οργάνων (Yost, 2013). Τα εν λόγω προβλήματα, είναι πιθανό να εξαλειφθούν, με κατάλληλη εκπαίδευση του προσωπικού και εφίσταση της προσοχής τους. Ακόμη, η σωστή βαθμονόμηση και συντήρηση των οργάνων είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και κοστοβόρα, γι' αυτό και συνηθίζεται η κακομεταχείρισή τους (Zuba, 2008).

Επιπρόσθετα, η ηλεκτροχημική αντίδραση οξειδωσης είναι εξαιρετικά επιλεκτική για την ανάλυση των πρωτοταγών αλκοολών και της ακετόνης, η οποία μπορεί να είναι αυξημένη στην αναπνοή υπό ορισμένες συνθήκες, αφού δεν οξειδώνεται στο ίδιο δυναμικό ηλεκτροδίου. Άλλα πτητικά στην αναπνοή, όπως ο αιθέρας, η ακεταλδεΐδη, η μεθανόλη, η 1-προπανόλη ή η ισοπροπανόλη οξειδώνονται, αλλά με διαφορετικούς ρυθμούς αντίδρασης από την αιθανόλη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της επιλεκτικότητας με διάφορους τρόπους. Ωστόσο, αυτά τα πτητικά είναι περισσότερο τοξικά από την αιθανόλη και κανονικά δεν υπάρχουν στην ανθρώπινη αναπνοή σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ώστε να αποτελούν πρόβλημα παρεμβολής (Alan W. Jones, 2019). Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες, όπως σε διαβήτη που δεν έχει ακόμη διαγνωστεί ή θεραπεύεται ανεπαρκώς, ή κάποια άλλη μεταβολική διαταραχή, ή μετά από δίαιτες χαμηλών υδατανθράκων, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης που εκπνέεται στην αναπνοή είναι υψηλότερες από τις κανονικές (Dubowski & Essary, 1984). Τα σύγχρονα όργανα ελέγχου αναπνοής που χρησιμοποιούν διαθέτουν πολλαπλά μήκη κύματος υπέρυθρων (IR) ή ανιχνευτές κυψελών καυσίμου για ανάλυση είναι σε θέση να διακρίνουν την ακετόνη από την αιθανόλη, επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος ψευδών μετρήσεων υψηλής αιθανόλης (Watterson, 2009). Συνεπώς, παρά την ευκολία στη χρήση της μεθόδου αυτής, σχεδόν πάντα κρίνεται απαραίτητη η μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και στο αίμα.



Εικόνα 2. Ψηφιακή συσκευή αλκοτέστ

(πηγή: <https://www.hwsensor.com/alcohol-testers/professional-breathalyzer/at8900.html>)

1.7.2 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας

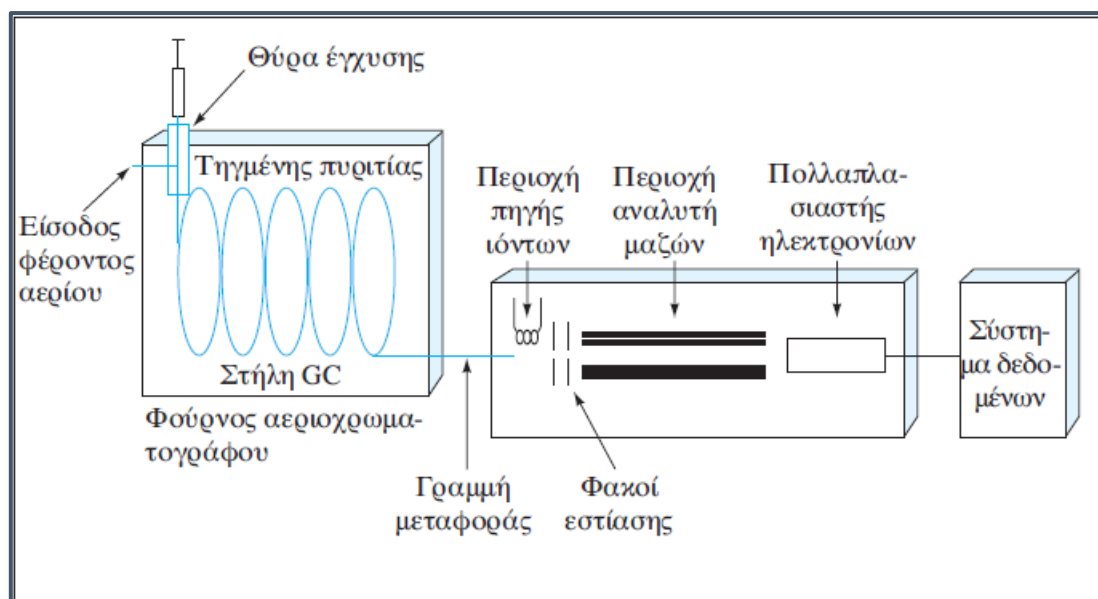
Η αέρια χρωματογραφία–φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι μια αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας για τον εντοπισμό διαφορετικών ουσιών στο αναλύόμενο δείγμα (Skoog et al., 2007). Οι εφαρμογές του GC-MS περιλαμβάνουν ανίχνευση ναρκωτικών, διερεύνηση πυρκαγιάς, περιβαλλοντική ανάλυση, έρευνα εκρηκτικών και ταυτοποίηση άγνωστων δειγμάτων. Το GC-MS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ασφάλεια του αεροδρομίου για τον εντοπισμό ουσιών στις αποσκευές ή σε ανθρώπους. Επιπλέον, μπορεί να αναγνωρίσει ιχνοστοιχεία σε υλικά που προηγουμένως θεωρούνταν ότι είχαν αποσυντεθεί πέρα από την αναγνώριση. Όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, επιτρέπει την ανάλυση και την ανίχνευση ακόμη και μικροσκοπικών ποσοτήτων μιας ουσίας, και θα συζητηθεί παρακάτω (American Chemical Society, 2019).

Το GC-MS αποτελείται από δύο κύρια δομικά στοιχεία: τον αέριο χρωματογράφο και το φασματόμετρο μάζας. Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιεί μια τριχοειδή στήλη για τον διαχωρισμό των μορίων, της οποίας οι ιδιότητες εξαρτώνται από τις διαστάσεις της στήλης (μήκος, διάμετρος, πάχος φιλμ) καθώς και από τις ιδιότητες της στατικής φάσης (π.χ. 5% φαινυλοπολυσιλοξάνη). Η διαφορά στις χημικές ιδιότητες μεταξύ διαφορετικών μορίων σε ένα μείγμα και η σχετική τους συγγένεια με τη στατική φάση της στήλης, προωθεί τον διαχωρισμό των μορίων καθώς το δείγμα διανύει το μήκος της στήλης. Τα μόρια συγκρατούνται από τη στήλη και στη συνέχεια εκλούνται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους, τους επονομαζόμενους «χρόνους κατακράτησης» και αυτό επιτρέπει στο φασματόμετρο μάζας προς τα κάτω να συλλάβει, να ιονίσει, να επιταχύνει, να εκτρέψει και να ανιχνεύσει τα ιονισμένα μόρια ξεχωριστά. Το φασματόμετρο μάζας το κάνει αυτό σπάζοντας κάθε μόριο σε ιονισμένα θραύσματα και ανιχνεύοντας αυτά τα θραύσματα χρησιμοποιώντας την αναλογία μάζας προς φορτίο (Skoog et al., 2007).

Αυτά τα δύο συστατικά, που χρησιμοποιούνται μαζί, επιτρέπουν πολύ λεπτότερο βαθμό ταυτοποίησης της ουσίας από ό,τι κάθε μονάδα που χρησιμοποιείται χωριστά. Δεν είναι δυνατό να γίνει ακριβής αναγνώριση ενός συγκεκριμένου μορίου μόνο με αέρια χρωματογραφία ή φασματομετρία μάζας. Η διαδικασία φασματομετρίας μάζας απαιτεί συνήθως ένα πολύ καθαρό δείγμα, ενώ η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας έναν παραδοσιακό ανιχνευτή (π.χ. ανιχνευτής ιονισμού φλόγας) δεν μπορεί να διαφοροποιήσει μεταξύ πολλών μορίων που τυχαίνει να χρειάζονται τον ίδιο χρόνο για να ταξιδέψουν μέσα στη στήλη (δηλαδή έχουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα δύο ή περισσότερα μόρια που

συνεκλούνται. Μερικές φορές δύο διαφορετικά μόρια μπορούν επίσης να έχουν παρόμοιο μοτίβο ιονισμένων θραυσμάτων σε ένα φασματόμετρο μάζας (φάσμα μάζας). Ο συνδυασμός των δύο διεργασιών μειώνει την πιθανότητα σφάλματος, καθώς είναι εξαιρετικά απίθανο δύο διαφορετικά μόρια να συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο τόσο σε αέριο χρωματογράφο όσο και σε φασματόμετρο μάζας. Επομένως, όταν ένα αναγνωριστικό φάσμα μάζας εμφανίζεται σε ένα χαρακτηριστικό χρόνο συγκράτησης σε μια ανάλυση GC-MS, συνήθως αυξάνει τη βεβαιότητα ότι η αναλυόμενη ουσία που ενδιαφέρει βρίσκεται στο δείγμα (Skoog et al., 2007).

Μακράν η πιο κοινή και ίσως τυπική μορφή ιονισμού είναι ο ιονισμός ηλεκτρονίων (EI). Τα μόρια εισέρχονται στο MS (η πηγή είναι ένα τετράπολο ή η ίδια η παγίδα ιόντων σε μια παγίδα ιόντων MS) όπου βομβαρδίζονται με ελεύθερα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από ένα νήμα, όχι σε αντίθεση με το νήμα που θα συναντούσε κανείς σε έναν τυπικό λαμπτήρα. Τα ηλεκτρόνια βομβαρδίζουν τα μόρια, προκαλώντας τον κατακερματισμό του μορίου με χαρακτηριστικό και αναπαραγωγίσιμο τρόπο. Αυτή η τεχνική «σκληρού ιονισμού» έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων θραυσμάτων χαμηλής αναλογίας μάζας προς φορτίο (m/z) και λίγων, αν υπάρχουν, μορίων που πλησιάζουν τη μονάδα μοριακής μάζας. Ο «σκληρός ιονισμός» θεωρείται από τους φασματομετρητές μάζας ως η χρήση μοριακού βομβαρδισμού ηλεκτρονίων, ενώ ο «μαλακός ιονισμός» είναι φορτίο από μοριακή σύγκρουση με ένα εισαγόμενο αέριο. Το πρότυπο μοριακού κατακερματισμού εξαρτάται από την ενέργεια των ηλεκτρονίων που εφαρμόζεται στο σύστημα, συνήθως 70 eV. Η χρήση 70 eV διευκολύνει τη σύγκριση των παραγόμενων φασμάτων με τα φάσματα βιβλιοθήκης χρησιμοποιώντας λογισμικό που παρέχεται από τον κατασκευαστή ή λογισμικό που αναπτύχθηκε από το Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων (NIST-ΗΠΑ). Οι πηγές βιβλιοθηκών περιλαμβάνουν το NIST (*Standard Reference Data | NIST*, 2017), Wiley (Wiley Science Solutions, 2019) το AAFS (“Mass Spectrometry Database Committee,” 2007) καθώς και τους κατασκευαστές των οργάνων (Amirav et al., 2008).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση τριχοειδούς αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC/MS) (Skoog et al., 2007).

1.7.3 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας

Η ανάπτυξη τυπικών τεχνικών αναλυτικής ανίχνευσης στην κλινική χημεία βασίζεται στα έμμεσα χαρακτηριστικά της αναλυόμενης ουσίας, π.χ. η απορρόφηση του φωτός, η χημική δραστηριότητα ή η φυσική αλληλεπίδραση με μακρομόρια (Vogeser & Kirchhoff, 2011). Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, οι τεχνολογίες LC-MS/MS έχουν επεκτείνει σημαντικά το μεθοδολογικό οπλοστάσιο των κλινικών εργαστηρίων (Vogeser & Seger, 2008). Έχει γίνει μια από τις βασικές βασικές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή ιατρική.

Στη μέθοδο MS, αντίθετα, οι αναλύμενες ουσίες ανιχνεύονται απευθείας από τα μοριακά χαρακτηριστικά ως σχήματα μοριακής μάζας και μοριακής αποσύνθεσης. Έτσι, οι τεχνικές MS είναι πολύ ελκυστικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών ή ξενοβιοτικών στο πλαίσιο διαγνωστικών διαδικασιών, καθώς αυτές οι τεχνικές μπορούν να επιτρέψουν αναλύσεις πολύ υψηλότερης εξειδίκευσης σε σύγκριση με τυπικές τεχνολογίες όπως η φωτομετρία ή οι δοκιμές δέσμευσης συνδέτη. Με το GC/MS, η πρώτη MS εισήχθη στην εργαστηριακή ιατρική πριν από περίπου 40 χρόνια. Το GC/MS επέτρεψε τον εξαιρετικά ειδικό και ευαίσθητο ποσοτικό προσδιορισμό θερμοσταθερών μορίων κάτω από ένα μοριακό βάρος περίπου 500 και έγινε βασική μέθοδος στον τομέα της τοξικολογίας. Όσον αφορά την τυποποίηση και τη διασφάλιση της ποιότητας των μεθόδων ρουτίνας ανάλυσης μικρών μορίων, η εισαγωγή του GC/MS ως μεθόδου αναφοράς ήταν μια ουσιαστική πρόοδος, ιδίως για την ενδοκρινολογία. Ωστόσο, για τους διάφορους λόγους που παρέμεινε η εφαρμογή του

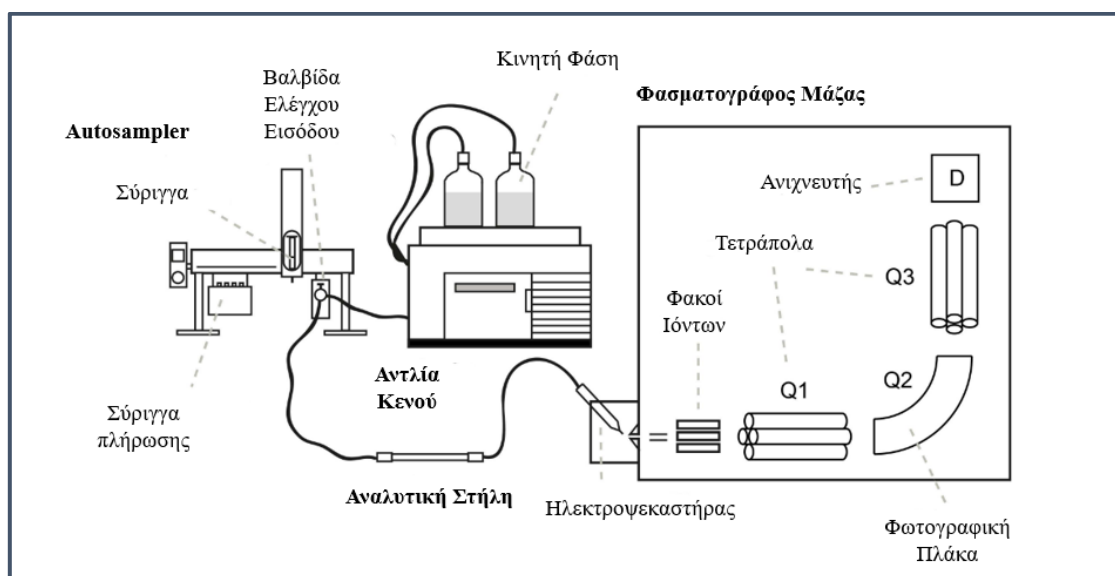
GC/MS περιορίζει πολύ λίγα εξειδικευμένα ιδρύματα στην εργαστηριακή ιατρική, συμπεριλαμβανομένων κυρίως των τοξικολογικών εργαστηρίων, του κέντρου μεταβολισμού και των εργαστηρίων αναφοράς. Ο χειρισμός και η συντήρηση των οργάνων GC-MS είναι πολύ απαιτητικός και χρονοβόρος. Η προετοιμασία του δείγματος είναι πολύ επίπονη και περιλαμβάνει εκχύλιση δειγμάτων και παραγωγοποίηση αναλυόμενης ουσίας. οι χρόνοι αναλυτικής εκτέλεσης είναι μεγάλοι με τυπική απόδοση δείγματος μικρότερη από 50 δείγματα την ημέρα (Vogeser & Kirchhoff, 2011).

Μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές, η LC-MS/MS, έχει οδηγήσει σε σημαντικές ανακαλύψεις στον τομέα της ποσοτικής βιοανάλυσης από τη δεκαετία του 1990 λόγω της εγγενούς ειδικότητας, ευαισθησίας και ταχύτητάς της. Είναι πλέον γενικά αποδεκτή ως η προτιμώμενη τεχνολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών μορίων φαρμάκων, μεταβολιτών και άλλων ξеноβιοτικών βιομορίων σε βιολογικές μήτρες όπως το πλάσμα, το αίμα, ο ορός, τα ούρα και οι ιστοί (Skoog et al., 2007).

Επειδή τα δείγματα από βιολογικές μήτρες συνήθως δεν είναι άμεσα κατάλληλα για την ανάλυση LC-MS/MS, η προετοιμασία του δείγματος είναι αναπόφευκτη και παραδοσιακά γίνεται με κατακρήμνηση των πρωτεϊνών (PPT), εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE) ή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Οι χειρονακτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την προετοιμασία του δείγματος είναι επίπονες και χρονοβόρες. Η παράλληλη επεξεργασία δειγμάτων, χρησιμοποιώντας ρομποτικούς χειριστές υγρών και η άμεση έγχυση πλάσματος με τη χρήση μεθόδου εκχύλισης on-line έχουν μειώσει σημαντικά τον χρόνο για ανάλυση και έχουν δημιουργήσει πολλά ενδιαφέροντα τα τελευταία χρόνια. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του on-line SPE έναντι των τεχνικών εκχύλισης off-line είναι ότι το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος περιλαμβάνεται στον χρωματογραφικό διαχωρισμό και έτσι εξαλείφει το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος. Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τις επιδράσεις της μήτρας του δείγματος (matrix effects) μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα των βιοαναλυτικών μεθόδων έχει τονίσει εκ νέου την ανάγκη για επαρκή χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών από ενδογενή βιολογικά συστατικά στην ποσοτική βιοανάλυση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο LC-MS/MS (Skoog et al., 2007).

Στην εφαρμογή αυτή, συλλέγονται φάσματα από ενώσεις καθώς εξέρχονται από μια χρωματογραφική στήλη. Στην LC/MS, αναλύονται μίγματα μη-πτητικών χημικών ουσιών. Σημαντικό πλεονέκτημα της συζευγμένης φασματομέτρα μαζών είναι η ταχύτατη ανάλυση.

Ενώ οι διαχωρισμοί σε μια χρωματογραφική στήλη απαιτούν κάποια λεπτά, έως και ώρες, επιτυγχάνονται εξίσου αποτελεσματικοί διαχωρισμοί με συζευγμένη φασματομετρία μαζών, σε μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου. Σημαντική είναι η συμβολή της εν λόγω τεχνικής στην ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών, και ιδίως των Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών (Novel Psychoactive Substances) (Florou & Boumba, 2021).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση υγρού χρωματογράφου με φασματοόμετρο μάζας. (Östman, 2018)

1.7.4 Αέρια Χρωματογραφία Υπερκείμενου Χώρου – Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας

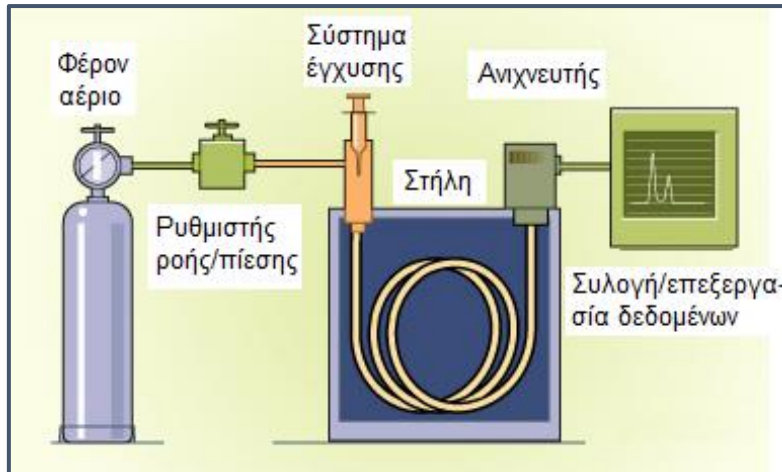
Η ανάλυση τόσο των κλινικών, όσο και των νεκροτομικών δειγμάτων αίματος, μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικά και με μεγάλη αξιοπιστία με απλή αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC). Στην πλειοψηφία των ιατροδικαστικών εργαστηρίων, επιστρατεύεται αέριος χρωματογράφος, με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και δειγματολήπτη υπερκείμενου χώρου (Headspace, HS). Δεν απαιτείται σύνθετος εξοπλισμός, ή ακόμη πιο σύνθετοι αναλυτές, μιας και η αιθανόλη και οι λοιπές πτητικές ενώσεις, διαχωρίζονται επαρκώς. Ακόμη, είναι δυνατόν να αναλυθεί πληθώρα βιολογικών δειγμάτων, ακολουθώντας το κατάλληλο πρωτόκολλο.

Η ανάλυση της αιθανόλης με χρήση HS-GC-FID απαιτεί αραίωση του δείγματος με ένα υδατικό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, που αναμειγνύεται και αφήνεται να εξισορροπηθεί στους 50 έως 60°C περίπου σε αεροστεγές γυάλινο φιαλίδιο με ελαστικά διαφράγματα και

πρεσαριστό καπάκι. Ο ατμός του αραιωμένου δείγματος θα αναρροφηθεί από την αυτοματοποιημένη συσκευή headspace και στη συνέχεια θα εγχυθεί στη χρωματογραφική στήλη. Στη ρουτίνα ενός εργαστηρίου ιατροδικαστικής τοξικολογίας, συνιστάται η χρήση διπλών στηλών κατασκευασμένων από δύο διαφορετικές σταθερές φάσεις, ειδικά με δείγματα αίματος που έχει υποστεί σήψη ή ιστών, καθώς αυτό θα συμβάλει στη μείωση του κινδύνου απόκτησης συμπτωμένων χρόνων έκλουσης (Alan Wayne Jones & Cowan, 2020).

Ο ιονισμός του διαλύματος έκλουσης στήλης των μορίων του φέροντος αερίου και της αναλυόμενης ουσίας λαμβάνει χώρα όπου η φλόγα υδρογόνου και αέρα καίγεται στους ανιχνευτές ιονισμού φλόγας. Υπάρχει ένα σταθερό ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ των ηλεκτροδίων στον ανιχνευτή και το διάκενο μεταξύ τους λειτουργεί ως μεταβλητή αντίσταση. Καθώς τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας ιονίζονται, η αντίσταση μειώνεται και ρέει περισσότερο ρεύμα. Αυτό το ενισχυμένο ρεύμα είναι η απόκριση του ανιχνευτή. Ο FID διακρίνεται για την ευαισθησία του και την ευρεία εφαρμογή του (Pinckard, 2001a).

Με έναν ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, το υγρό έκλουσης κατευθύνεται από τη στήλη σε μια φλόγα αέρα – H₂. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις, όταν πυρολυθούν στη θερμοκρασία της εν λόγω φλόγας, παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια, τα οποία άγουν τον ηλεκτρισμό, μέσω της φλόγας. Η ανίχνευση γίνεται με μέτρηση του ρεύματος που παράγεται από τη συλλογή των φορτισμένων φορέων. Το γεγονός ότι ο ανιχνευτής δεν αποκρίνεται καθόλου σε μη καύσιμα αέρια (πχ. H₂O, CO₂, CO, SO₂ ευγενή αέρια και NO_x), τον καθιστά εξαιρετικά χρήσιμο γενικό αναλυτή, για ανάλυση των περισσότερων οργανικών δειγμάτων, ακόμη και αν έχουν επιμολυνθεί με νερό ή οξείδια του θείου ή του αζώτου. Ακόμη, διακρίνεται από μεγάλη ευαισθησία (~10⁻¹³ g/s), μεγάλη γραμμική περιοχή (~10⁷) και χαμηλό θόρυβο. Εν γένει, είναι ανθεκτικός και εύχρηστος. Μειονέκτημά του αποτελεί η καταστροφή του δείγματος κατά τη διάρκεια της καύσης, ενώ χρειάζεται επιπλέον αέρια και ρυθμιστές (Skoog et al., 2007).



Εικόνα 5. Διάγραμμα Αέριου Χρωματογράφου (Skoog et al., 2007)



Εικόνα 6. Ο Αέριος Χρωματογράφος, με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας και το Headspace, του εργαστηρίου μας

Επιλογή Κατάλληλου Εσωτερικού Προτύπου

Η χρήση των πτητικών 1-προπανόλη, ισοβουτανόνη, βουτανόνης και 1-βουτανόλης ως εσωτερικά πρότυπα δεν συνιστάται, επειδή αυτά τα πτητικά μπορεί να υπάρχουν στο αίμα που λαμβάνεται μεταθανάτια. Αντίθετα, το ακετονιτρίλιο προτάθηκε στη βιβλιογραφία ως μια πολλά υποσχόμενη ένωση που θα χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο, καθώς δεν είναι προϊόν μικροβιακής δραστηριότητας (V. A. Boumba et al., 2008).

Η 1-προπανόλη είναι ένα σημαντικό προϊόν σήψης που δεν περιέχεται σε αλκοολούχα ποτά ή δείγματα από εν ζώή άτομα και επομένως θα μπορούσε να θεωρηθεί ως δείκτης για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (Moriya & Hashimoto, 2004). Η 1-προπανόλη υπάρχει σε μεγαλύτερες ποσότητες επειδή η παραγωγή της συνεχίζεται ακόμη και όταν η παραγωγή αιθανόλης έχει φτάσει στο μέγιστο όριο, το οποίο ισοδυναμεί με 30 mg/dL (O'Neal & Poklis, 1996). Η αναλογία συγκέντρωσης αιθανόλης προς 1-προπανόλη έχει χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιωθεί ο μεταθανάτιος σχηματισμός αιθανόλης (Moriya & Hashimoto, 2004).

Η παρουσία της 1-προπανόλης, λοιπόν, σε μεταθανάτια δείγματα την καθιστά ακατάλληλη ως εσωτερικό πρότυπο όταν χρησιμοποιείται HS-GC-FID για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων σε νεκροτομικά δείγματα, αλλά αυτό δεν ισχύει για δείγματα που συλλέγονται από άτομα εν ζώή. Η ισοβουτανόλη τείνει να ανιχνεύεται σε σώματα που ανακτώνται από το νερό και έχει επίσης θεωρηθεί καλός δείκτης μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης (V. A. Boumba et al., 2008). Έχει αναφερθεί από τους (Kuhlman et al., 1991) ότι η βουτανόνη δεν παράγεται μεταθανάτια, και πως μαζί με τη μεθανόλη, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδεικτικά της εν ζώή έκθεσης στο αλκοόλ (π.χ. κατανάλωση αλκοολούχων ποτών), είτε μόλυνσης (π.χ. μεθανόλη βρίσκεται στο υγρό ταρίχευσης) (Saier, 1996)

Σύμφωνα με τους (Canfield et al., 1998) 2.800 δείγματα αίματος από θανάτους πιλότων αναλύθηκαν σε διάστημα 8 ετών για να αξιολογηθούν τα επίπεδα πτητικών που σχετίζονται με αεροπορικά δυστυχήματα. Διερευνήθηκε μια αξιολόγηση μεταξύ τριών εσωτερικών προτύπων (προπανάλη, μεθυλεστέρας προπιονικού οξέος και t-βουτανόλη), με την t-βουτανόλη να πληροί τα κριτήρια επιλογής. Συγκεκριμένα, το εσωτερικό πρότυπο δεν πρέπει να υπάρχει ούτε σε δείγματα ζώντων ή θανόντων. Ακόμη, θα πρέπει να έχει παρόμοιες ιδιότητες με την αναλυόμενη ουσία που μας ενδιαφέρει, ενώ ο χρόνος έκλυσης πρέπει να είναι στο μεσαίο εύρος του χρόνου έκλυσης των αναλυτών που διαχωρίζονται. Τέλος, θα πρέπει να διαχωρίζεται επαρκώς από όλα τα συστατικά του μείγματος (Canfield et al., 1998). Επιπλέον, η τυπική απόκλιση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων της αιθανόλης όταν

χρησιμοποιήθηκε η t-βουτανόλη ως εσωτερικό πρότυπο ήταν καλύτερη από την 1-προπανόλη και ο χρόνος κατακράτησης για την t-βουτανόλη ήταν στο μεσαίο εύρος των ενώσεων που διαχωρίστηκαν, ενώ η 1-προπανόλη όχι. Σημειώνεται ότι η t-βουτανόλη δεν βρέθηκε μετά από εξέταση 2.880 δειγμάτων μετά θάνατον από πιλότους (Canfield et al., 1998). Παρόλο που η τεταρτοταγής βουτανόλη (t-βουτανόλη) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως εσωτερικό πρότυπο, η συγκέντρωσή της εμφανίζεται μειωμένη σε δείγματα με αυξημένο λιπιδικό περιεχόμενο (Bonventre et al., 1982).

Στον παρακάτω πίνακα, συγκεντρώνονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, σχετικά με τη χρήση διαφορετικών εσωτερικών προτύπων στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων, με Αέρια Χρωματογραφία Υπερκείμενου Χώρου με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας.

Πίνακας 4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα διαφορετικών εσωτερικών προτύπων, για τη χρήση τους στην ανάλυση πτητικών με HS-GC-FID

Εσωτερικό Πρότυπο	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Βιβλιογραφική Αναφορά
Ακετονιτρίλιο	Δεν είναι προϊόν μικροβιακής δραστηριότητας – διαχωρίζεται καλά με τη χρήση τριχοειδών στηλών Rtx BAC1 ή ALC1	Δεν χρησιμοποιείται συχνά. 100% επικάλυψη με ακετόνη χρησιμοποιώντας τριχοειδείς στήλες Rtx-BAC2 και ALC2	(V. A. Boumba et al., 2008)
Προπανάλη	Λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια εσωτερικών προτύπων, επιλέχθηκε ως πιθανός αντικαταστάτης της 1-προπανόλης Ο χρόνος έκλουσής της είναι κοντά με αυτόν της αιθανόλης	Δεν πραγματοποιείται αποδεκτός διαχωρισμός στη baseline για ενώσεις που απαντώνται συνήθως μεταθανάτια	(Canfield et al., 1998)
Μεθυλεστέρας του προπιονικού εστέρα	Λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια εσωτερικών προτύπων, επιλέχθηκε ως πιθανός αντικαταστάτης της 1-προπανόλης Ο χρόνος έκλουσής της είναι κοντά με αυτόν της αιθανόλης	Δεν είναι σταθερό και η συγκέντρωσή του μειώνεται με το χρόνο, επηρεάζοντας την ποσοτικοποίηση	(Canfield et al., 1998)
t-βουτανόλη	Συμβατό με τα κριτήρια για την επιλογή εσωτερικού προτύπου	Η συγκέντρωσή του μειώνεται με την αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου του δείγματος	(Canfield et al., 1998)
1-προπανόλη	Διαχωρίζεται επαρκώς από την ακετόνη	Κύριο προϊόν σήψης και ο χρόνος έκλουσης δε βρίσκεται στο εύρος των διαχωριζόμενων ουσιών	(V. A. Boumba et al., 2008)
Ισοβουτανόλη	Διαχωρίζεται επαρκώς από τα λοιπά πτητικά, σε στήλες Rtx-BAC2	Βιοδείκτης μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης	(V. A. Boumba et al., 2008)
Μεθανόλη	Δεν παράγεται μεταθανάτια	Πιθανός δείκτης εν ζώη έκθεσης σε αλκοόλ, ή επιμόλυνσης από το υλικό ταρρίχευσης	(Kuhlman et al., 1991)

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία ανάπτυξης μιας μεθόδου για την ανάλυση των πτητικών σε βιολογικά υλικά, είναι σημαντικό να καθοριστεί πρώτα η ευαισθησία και το γραμμικό εύρος που απαιτείται. Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τις συγκεντρώσεις πτητικών που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία από μια σειρά περιπτώσεων όπου μετρήθηκαν χαμηλά επίπεδα πτητικών μέχρι υψηλές συγκεντρώσεις σε θάνατο που σχετίζονται με πτητικές ουσίες. Αυτά παρέχουν μια ένδειξη τόσο του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) όσο και του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) για κάθε πτητικό.

Για νομικούς σκοπούς, συνιστάται ιδιαίτερα όλοι οι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα να γίνονται εις διπλούν με κατώφλι τα 10 mg/dL.

Πίνακας 5. Επίπεδα πτητικών ενώσεων στο αίμα

Πτητική Ένωση	Ενδογενές Επίπεδο στο Αίμα (mg/dL)	Επίπεδο Τοξικότητας στο Αίμα (mg/dL)	Βιβλιογραφική Αναφορά
Αιθανόλη	0,04 – 0,1	80 – 100 (>350)	(Winek et al., 2001)
Μεθανόλη	<10	20 (>89)	(Winek et al., 2001)
	0,1 – 2,3	2 θνητότητες (219, 196)	(Kinoshita et al., 1998)
Ακετόνη	Ορός αίματος : 2,3 – 3,5	20 – 30	(Brinkmann et al., 1998)
	Μη διαβητικά άτομα : <10	55	(Brinkmann et al., 1998)
Ισοπροπανόλη	0,1 – 0,2 mg/kg	>40	(Winek et al., 2001)
1-προπανόλη	Σε μεταθανάτιο αίμα : 3,7	200 ppm	(V. A. Boumba et al., 2008)

Αν και πρόκειται για σημαντικό και εύκολο στη χρήση του εργαλείο των τοξικολόγων, η προκείμενη τεχνική μειονεκτεί κοστολογικά. Το κόστος του εξοπλισμού είναι μεγάλο, ενώ

απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για το χειρισμό των δειγμάτων και του οργάνου. Ακόμη, η εμπειρία που θα πρέπει να διαθέτουν οι χειριστές του, όσον αφορά στη συντήρησή του, είναι δυσεύρετη. Πάντα θα πρέπει να δίνεται προσοχή στο σωστό καθαρισμό της σύριγγας και της στήλης, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση ακαθαρσιών. Αυτές, μπορούν να προκαλέσουν την εξαγωγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων, και δυσκολία στον καθαρισμό. Τέλος, ο χώρος της εγκατάστασής του συστήνεται να είναι μεγάλος (De Martinis et al., 2004).

1.7.5 Διαδερμική Ανίχνευση της Αιθανόλης

Οι μη επεμβατικές μέθοδοι προσδιορισμού της αιθανόλης ήταν πάντα στο στόχαστρο των ερευνητών. Η διαδερμική ανίχνευση της αιθανόλης είναι πλήρως μη επεμβατική. Περίπου το 1% της ολικής αιθανόλης του αίματος, εκπνέεται από τον ιδρώτα, διαδερμικά, και η μέτρησή της γίνεται σε πρώτο χρόνο. Η εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής, αφορά κυρίως σε άτομα που έχουν υποχρεωθεί νομικά σε αποχή από το αλκοόλ (Dougherty et al., 2012).

Η πρώτη αναφορά στην προκείμενη ανάλυση, έγινε το 1936, όποτε πραγματοποιούνταν ποιοτικός έλεγχος, με τη χρήση ειδικών αυτοκόλλητων. Στη συνέχεια, με τη χρήση του ίδιου αυτοκόλλητου και ενός fuel cell, ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση της αιθανόλης (Hawthorne & Wojcik, 2006). Αργότερα, αναπτύχθηκαν ειδικές μεμβράνες πολυαιθυλενίου, οι οποίες συγκέντρωναν τον ιδρώτα, ενώ η ανάλυσή του, γινόταν με φασματομετρία απορρόφησης (Hawthorne & Wojcik, 2006). Σήμερα, χρησιμοποιούνται κυρίως ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη ευκολία στη χρήση, καθώς και ακρίβεια. Ο λόγος της περιεκτικότητας της αιθανόλης στον ιδρώτα, προς αυτήν στο αίμα, είναι 0,71.

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, είναι η μηδενική επεμβατικότητα. Ακόμη, τα αποτελέσματα ανακοινώνονται άμεσα, και είναι δύσκολη η νόθευσή τους. Τέλος, πλέον μειώνεται κατά πολύ η έκθεση σε διάφορες ασθένειες, όπως ο ιός του HIV, που ενδέχεται να φέρουν οι εξεταζόμενοι (Gamella et al., 2014).

1.7.6 Ανίχνευση Αιθανόλης στα Ούρα

Σε περιπτώσεις που είναι δύσκολη η συλλογή δείγματος αίματος, ή ο/η εξεταζόμενος/η αρνούνται να το προσφέρουν, τα ούρα αποτελούν χρήσιμο βιολογικό υλικό. Εξάλλου, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αιθανόλη περνά στα ούρα, μετά το μεταβολισμό της. Κατά

κύριο λόγο, ο προσδιορισμός της αιθανόλης στα ούρα, πραγματοποιείται με Headspace GC. Υπενθυμίζεται ότι το όριο ποσοτικοποίησης είναι στα 10 mg/L, το όριο ανίχνευσης στα 8 mg/L, ενώ η αιθανόλη, η ακετόνη και η ακεταλδεΐδη, διαχωρίζονται ικανοποιητικά.

Ακόμη, στα ούρα εντοπίζονται και άλλοι μεταβολίτες της, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες κατανάλωσης των αλκοολούχων ποτών. Στην κατηγορία αυτών των μεταβολιτών ανήκουν η ακεταλδεΐδη και το αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG). Το τελευταίο, εκκρίνεται στα ούρα περίπου 6-10 ώρες από την κατανάλωση αλκοόλ, και μπορεί να ανιχνευθεί με αέρια χρωματογραφία και υγρή χρωματογραφία, συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας, (LC-MS) (Helander & Beck, 2004). Για την ανάλυση των δειγμάτων δε χρειάζεται ιδιαίτερη προκατεργασία, αρκεί να βρίσκονται σε υγρή μορφή. Ακόμη, ο προσδιορισμός του EtG, μπορεί να γίνει και από αφυδατωμένες σταγόνες δείγματος (Kummer et al., 2016). Η χρησιμότητα της ανίχνευσης του EtG, έγκειται στον έλεγχο ατόμων, στα οποία έχει απαγορευτεί η κατανάλωση αλκοόλ.

1.7.7 Ανίχνευση Αιθανόλης στη Σίελο

Ακόμη μια μη επεμβατική μέθοδος ανίχνευσης της αιθανόλης, χρησιμοποιεί σαν βιολογικό υλικό τη σίελο. Βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε άτομα που αρνούνται να προσφέρουν κάποιο άλλο βιολογικό υλικό, ή δεν δύνανται (πχ. βρίσκονται σε κωματώδη κατάσταση). Αξιοποιούνται, κυρίως, ενζυμικές μεθόδους, συζευγμένες με φωτόμετρα ή φθορισμόμετρα (Linares et al., 1987), ενζυμικές μεθόδους συζευγμένες με χρωματογραφικές στήλες (A. W. Jones, 1995), χρωματογραφία αερίων (Linares et al., 1987) και ειδικές ταινίες ανίχνευσης αιθανόλης στη σίελο (Degutis et al., 2004). Οι ειδικές ταινίες (εικ.7) περιέχουν το ένζυμο αλκοολική οξειδάση και αλλάζουν χρώμα ανάλογα με την ποσότητα της αιθανόλης στη σίελο (JANT_Pharmacal_Corporation, n.d.). Σε γενικές γραμμές τα δείγματα σιέλου εξετάζονται χωρίς να γίνει κάποια ιδιαίτερη προεργασία σε αυτά, γεγονός που αυξάνει την ευκολία των αναλύσεων.



Εικόνα 7. Ταινίες ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της αιθανόλης στη σίελο (JANT_Pharmacal_Corporation, n.d.)

1.8 Νεκροτομικό Βιολογικό Υλικό

Η θέση από την οποία λαμβάνεται ένα δείγμα από το σώμα για ανάλυση είναι εξέχουσα σημασίας. Κατά την απορρόφησή της, η συγκέντρωση της αιθανόλης σε διάφορα μέρη του σώματος μπορεί να ποικίλλει (Caplan & Goldberger, 2008). Σε ζωντανά άτομα, το αρτηριακό αίμα αναφέρεται ως το ιδανικό δείγμα αίματος για τον προσδιορισμό της αιθανόλης, επειδή η συγκέντρωσή της συσχετίζεται καλά με τη βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Mason & Dubowski, 1974). Το πλάσμα, ο ορός, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) και το σάλιο περιέχουν περισσότερο νερό από το ολικό αίμα. Ως εκ τούτου, αναμένεται να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης σε κατάσταση ισορροπίας. Οι αναλογίες συγκέντρωσης αιθανόλης ορού-αίματος ποικίλλουν από 1,12 – 1,17, ενώ οι αναλογίες πλάσματος-αίματος κυμαίνονται από 1,10 – 1,35, με μέσο όρο 1,18. Δε συναντάται σημαντική διαφορά μεταξύ της αναλογίας ορού – αίματος και πλάσματος αίματος (Payne et al., 1968) Η μέση αναλογία συγκέντρωσης αιθανόλης σε δείγματα σάλιου : αίματος είναι 1,08 και είναι ανεξάρτητη από το χρόνο δειγματοληψίας (A. W. Jones, 1979). Το πλεονέκτημα του δείγματος σάλιου έγκειται στην ευκολία συλλογής του, μιας και πραγματοποιείται με μη επεμβατικές μεθόδους και υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης αιθανόλης στο σάλιο και του φλεβικού αίματος, και της συγκέντρωσής της στην αναπνοή (A. W. Jones, 1995).

Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης αλκοόλ στα ούρα (Urinary Alcohol Concentration, UAC) και της BAC. Η πλειονότητα αυτών των μελετών υποδηλώνει ότι η αναλογία είναι 1,3:1, ωστόσο, πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις στα ούρα, όπως ο χρόνος μετά το ποτό, ο χρόνος που έχει αδειάσει η κύστη,

καθώς και τυχόν υπόλειμμα ούρων χωρίς αλκοόλ που προϋπήρχαν στην κύστη, πριν έναρξη κατανάλωσης αλκοόλ. Σε αυτήν την περίπτωση, θα ήταν διακριτή η τάση αραίωσης των ούρων μετά την κατανάλωση αιθανόλης. Ακόμη, συλλογή δειγμάτων ούρων για εγκληματολογικούς σκοπούς πρέπει να επιτηρείται προσεκτικά, ώστε να αποφευχθεί η εσκεμμένη ή κατά λάθος αλλοίωση του δείγματος, ενώ θα πρέπει επίσης να συλλέγονται σε φιαλίδιο με κατάλληλο συντηρητικό (A. W. Jones et al., 2000).

Στο υλικό που έχει ληφθεί έπειτα από νεκροτομή, η ερμηνεία του αλκοόλ που βρέθηκε καθίσταται δυσκολότερη, εάν δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο θανάτου, το στάδιο κατανομής της αιθανόλης στο σώμα, τις συνθήκες αποθήκευσης και τη θερμοκρασία των διαθέσιμων δειγμάτων.

Ιδανικός δειγματοληπτικός τύπος σε μια νεκροτομή, είναι η μηριαία φλέβα, από όπου λαμβάνεται περιφερικό. Το καρδιακό αίμα, που λαμβάνεται από την αορτή και κοίλη φλέβα, ερμηνεύεται με προσοχή όταν υπάρχει υποψία επιμόλυνσης στον τόπο ανεύρεσης (Carlan & Goldberger, 2008), ενώ η συλλογή καρδιακού αίματος συνιστάται μόνο όταν το μηριαίο αίμα είναι μη διαθέσιμο (Cooper et al., 2010). Το αίμα που συλλέγεται από τη θωρακική κοιλότητα, που πρόκειται για περικαρδιακό αίμα, δεν είναι ιδανικό, καθώς είναι ευαίσθητο σε επιμολύνσεις από το στομάχι. Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης στο καρδιακό αίμα και στο μηριαίο φλεβικό αίμα μετά το θάνατο μπορεί να αντικατοπτρίζουν τις συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα τη στιγμή του θανάτου, ωστόσο, ορισμένοι περιθανάτιοι φυσικοί παράγοντες που σχετίζονται με το θάνατο, π.χ. η καρδιοπνευμονική αναζωογόνηση (ΚΑΡΠΙΑ) ή η μαζική αιμορραγία, μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις εξωγενούς αιθανόλης στο καρδιακό αίμα (Moriya et al., 2005).

Σε πολλές καταστάσεις θανάτου, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου από σοβαρό τραύμα, το αίμα από τα κεντρικά και περιφερειακά σημεία δεν είναι διαθέσιμο κατά τη διάρκεια της αυτοψίας και άλλα σωματικά υγρά χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της συγκέντρωσης αιθανόλης, όπως ούρα, υαλοειδές υγρό (VH) και χολή (Pinckard, 2001b). Με τα ούρα, η παρουσία ζάχαρης και μαγιάς μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με ζύμωση (A. W. Jones & Holmgren, 2003) Υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα βακτηριακής μόλυνσης εάν το δείγμα δεν αποθηκευτεί σωστά. Το υαλοειδές υγρό (Vitreous humor, VH) είναι το δείγμα επιλογής σε καταστάσεις όπου το σώμα έχει υποστεί εκτεταμένο τραύμα (A. W. Jones, 2000). Ο μεταθανάτιος σχηματισμός αλκοόλ στο υαλοειδές υγρό είναι αμελητέος και επομένως οποιαδήποτε αιθανόλη υπάρχει στο VH πιθανότατα αντανακλά αλκοόλ που καταναλώθηκε

και δεν σχηματίζεται (A. W. Jones & Holmgren, 2001) Οι De Lima & Midio, 1999 ανέφεραν ότι η συγκέντρωση αλκοόλης στο υαλοειδές (Vitreous Alcohol Concentration, VAC) είναι υψηλότερη από την BAC κατά τη φάση μετά την απορρόφηση λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υαλοειδούς υγρού σε νερό. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε από τους Honey et al., 2005 οι αναλογίες κυμαίνονταν μεταξύ δειγμάτων από 1,01 – 2,20. Πιθανοί λόγοι για το $BAC \geq VAC$ θα ήταν όταν ο θάνατος επέρχεται πριν επιτευχθεί ισορροπία, εάν σχηματιστεί ενδογενής αιθανόλη στη νεκροψία ή εάν το δείγμα αίματος έχει μολυνθεί κατά τη συλλογή του δείγματος.

Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση αλκοόλης στο αίμα της χολής είναι λιγότερο ευμετάβλητο και περισσότερο αξιόπιστο από άλλους ιστούς για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης αλκοόλ στο αίμα τόσο στη φάση μετά την απορρόφηση όσο και στη φάση προαπορρόφησης. Μια σειρά εναλλακτικών βιολογικών υγρών και ιστών έχει αξιολογηθεί σε σύγκριση με το αίμα για την ανίχνευση αιθανόλης στους ζωντανούς και μετά το θάνατο και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ο διαχωρισμός της αιθανόλης, και η απόφαση για την ενδογενή ή εξωγενή προέλευσή της, αποτελεί ισχυρή πρόκληση. Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένες ερωτήσεις, που διευκολύνουν την απόφαση αυτή. Για παράδειγμα, υπάρχει ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ; Ποιες ήταν οι συνθήκες θανάτου; Ανιχνεύεται αλκοόλ στο αίμα που έχει ληφθεί από τη θωρακική κοιλότητα, αλλά όχι στο υαλοειδές υγρό ή τα ούρα; Ανιχνεύεται αιθανόλη στα βιολογικά υγρά, και ειδικότερα στο υαλοειδές υγρό; Ανιχνεύονται άλλες αλκοόλες στα δείγματα, με έμφαση στην 1-προπανόλη και τη 2-προπανόλη; (A. W. Jones & Holmgren, 2001).

Τέλος, μπορεί να παρουσιαστούν περιπτώσεις όπου έχουν πραγματοποιηθεί μεταγγίσεις αίματος με αποτέλεσμα την προθανάτια αραιώση του αίματος που δυνητικά οδηγεί σε χαμηλό ή ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα για το αλκοόλ. Ακόμη, τα σώματα που έχουν ταριχευτεί αποτελούν πραγματική πρόκληση καθώς το υγρό ταρίχευσης αντικαθιστά το μεγαλύτερο μέρος του αίματος και τα υγρά ταρίχευσης περιέχουν φορμαλδεΰδη και μεθανόλη. Αν και η αιθανόλη μπορεί να υπάρχει σε ορισμένα υγρά της κοιλότητας, το υαλοειδές υγρό θα ήταν η προτιμώμενη μήτρα σε αυτές τις περιπτώσεις (Moskowitz & Lawyers & Judges Publishing Company, 2008).

Πίνακας 6. Αναλογία αιθανόλης σε διάφορα νεκροτομικά βιολογικά υλικά

Βιολογικό Υλικό	Μέση αναλογία (εύρος)	N	Βιβλιογραφική Αναφορά
Ούρα	Οξεία δηλητηρίαση από αλκοόλ	Mean 1.18 (0.87-1.53)	628 (A. W. Jones & Holmgren, 2003)
	Αλκοολικός θάνατος	Mean 1.30 (0.87-2.10)	647 (A. W. Jones & Holmgren, 2003)
Πλάσμα		Mean 1.18 (1.10- 1.35)	20 (Payne et al., 1968)
Ορός		Mean 1.16 (1.12- 1.17)	- (Caplan & Goldberger, 2008)
Υαλοειδές Υγρό		Mean 1.19 (0.63-1.75)	672 (A. W. Jones & Holmgren, 2001)
Χολή		Mean 1.01 (0.44-1.40)	33 (Winek & Esposito, 1981)
Σάλιο		Mean 1.08 (1.065-1.088)	336 (Winek et al., 1983)
Εγκέφαλος		Mean 0.86 (0.64-1.2)	33 (Backer et al., 1980)
Ήπαρ	Βίαιος θάνατος	Mean 0.63 (0.51-0.83)	- (Christopoulos et al., 1973)
	Οξεία δηλητηρίαση από αλκοόλ	Mean 0.60 (0.54-0.72)	- (Christopoulos et al., 1973)

1.9 Βιοδείκτες Κατανάλωσης Αιθανόλης

Ως βιοδείκτες, σύμφωνα με το NIH Biomarkers Definitions Working Group, χαρακτηρίζονται «οι ουσίες που μετρούνται αντικειμενικά και αξιολογούνται ως μια ένδειξη διεργασιών, είτε πρόκειται για φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, για παθογόνες διεργασίες, ή φαρμακολογικές αποκρίσεις σε κάποια θεραπευτική παρέμβαση» (Achur et al., 2010). Όσον αφορά στην περίπτωση της αιθανόλης, δεν είναι γνωστοί τύποι βιομορίων, όπως πρωτεΐνες ή

νουκλειϊνικά οξέα, που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως καλύτεροι βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης. Εντούτοις, αναλύονται χημικά μόρια που προκύπτουν από τις μεταβολικές οδούς της αιθανόλης. Σημειώνεται, δε, ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν εκλέγεται ένας συγκεκριμένος βιοδείκτης, μα συνδυασμός τους. Έτσι, επιτυγχάνεται καλύτερο αναλυτικό αποτέλεσμα, αναφορικά με την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Υπάρχουν δύο τύποι βιοδεικτών της αιθανόλης: οι έμμεσοι και οι άμεσοι δείκτες. Η διαφορά μεταξύ των δύο είναι ότι οι άμεσοι δείκτες σχηματίζονται κατά το μεταβολισμό της αιθανόλης, ενώ οι άμεσοι αντανακλούν μεταβολές σε άλλα μόρια, κύτταρα ή ιστούς, οι οποίες προκύπτουν από οξεία ή χρόνια έκθεση στο αλκοόλ (Jastrzabska et al., 2016). Οι έμμεσοι δείκτες αποτελούνται από όλους τους τύπους ηπατικών ενζύμων όπως η γ-γλουταμυλική τρανσφεράση (γGT) και η τρανσφερίνη με έλλειψη υδατανθράκων (CDT). Επίσης, ο μέσος όγκος ερυθρών (MCV) είναι ένας έμμεσος δείκτης αλκοόλης. Το πρόβλημα με τους έμμεσους δείκτες είναι ότι επηρεάζονται από άλλους παράγοντες εκτός από την πρόσληψη αλκοόλ, όπως οι παθολογικές καταστάσεις, η ηλικία, το φύλο, ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα, η ανορεξία και τα ναρκωτικά. Η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτών των δεικτών είναι χαμηλές και απαιτείται μεγάλη ποσότητα αλκοόλ για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν γίνουν ορατές αλλαγές (Hannuksela et al., 2007; Maenhout et al., 2013; Winkler et al., 2013)

Οι άμεσοι δείκτες, από την άλλη, είναι περισσότερο κατάλληλοι για τη δικαστική και κλινική αξιολόγηση της πρόσληψης αλκοόλ. Η αιθανόλη, το αιθυλογλυκουρονίδιο, ο θεϊικός αιθυλεστέρας, η φωσφατιδυλοαιθανόλη και οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων είναι οι πιο σημαντικοί άμεσοι δείκτες πρόσληψης αλκοόλ. Αυτοί οι δείκτες ρυθμίζονται προς τα ανώτερα επίπεδα συγκέντρωσης στο σώμα μετά από έκθεση σε αιθανόλη (Hannuksela et al., 2007; Maenhout et al., 2013; Winkler et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι η θετική ανίχνευση αιθανόλης δεν οφείλεται πάντα στην πρόσληψη αλκοολούχων ποτών, καθώς αλκοόλ μπορεί να υπάρχει σε ώριμες μπανάνες, μη αλκοολούχες μπύρες, χυμούς φρούτων και το ξινό λάχανο (Musshoff et al., 2010) Ακόμη και η χρήση απολυμαντικών χεριών που περιέχουν αλκοόλ μπορεί να οδηγήσει σε θετικό αποτέλεσμα ως προς την αιθανόλη (Thierauf et al., 2009).

Καθένας από τους εν λόγω βιοδείκτες, μπορούν να καλύψουν μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο έπειτα από την κατανάλωση αλκοόλ. Το επίπεδο αιθανόλης στο αίμα, μπορεί να δώσει απαντήσεις μόνο λίγες ώρες μετά την κατανάλωση, ενώ οι δείκτες, για τους οποίους γίνεται λόγος, καλύπτουν μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, από τη στιγμή της λήψης αλκοόλ. Συγκεκριμένα, το EtG και οι FAEEs είναι ανιχνεύσιμα για μερικούς μήνες στις τρίχες. Ωστόσο,

επειδή η ανάπτυξη της τρίχας περνά από διάφορες φάσεις, απαιτείται η διέλευση κάποιου χρονικού διαστήματος, πριν την ανάλυση. Ακόμη, αν και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η ανάλυση της τρίχας, το δείγμα επιμολύνεται εύκολα και προκύπτουν σφάλματα στις αναλύσεις (Maenhout et al., 2013).

Το κύριο μειονέκτημα αυτών των δεικτών είναι ότι εξακολουθούν να έχουν ένα αρκετά μικρό παράθυρο ανίχνευσης. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση για έναν καλύτερο δείκτη που μπορεί να ανιχνεύσει την πρόσφατη κατανάλωση αλκοόλ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να μπορεί να διαφοροποιήσει μεταξύ της κοινωνικής κατανάλωσης αλκοόλ, της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ και της αποχής αλκοόλ εξακολουθεί να βρίσκεται σε εξέλιξη (Shi et al., 2012).

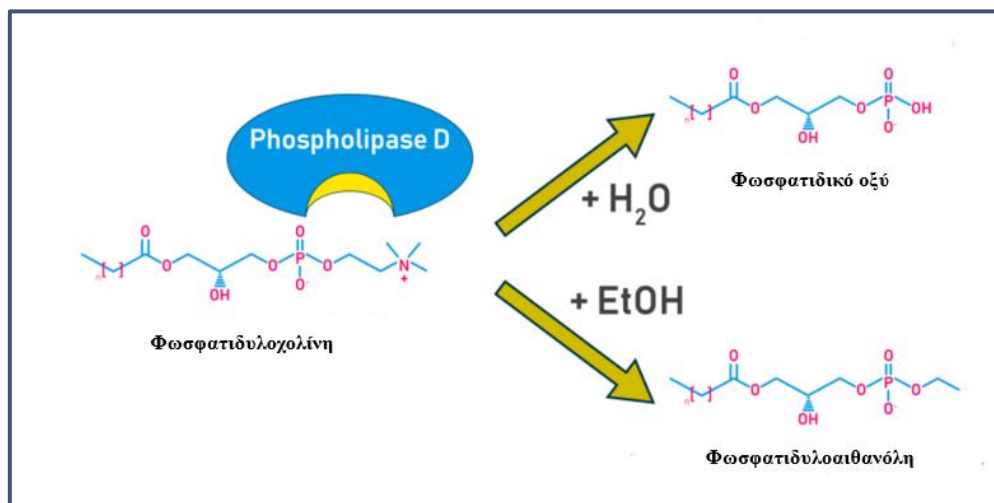
Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά οι άμεσοι βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης.

1.9.1 Φωσφατιδυλοαιθανόλη

Η φωσφατιδυλοαιθανόλη, είναι ένα φωσφολιπίδιο, που φέρει δύο καρβοξυλομάδες μακριάς αλυσίδας, και αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως πιθανός βιοδείκτης της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ για εγκληματολογική χρήση (Isaksson et al., 2011). Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η αντίδραση μεταξύ αιθανόλης και φωσφατιδυλοχολίνης καταλύεται από τη φωσφολιπάση D, ένα ένζυμο παρόν στα θηλαστικά. Για πολλά χρόνια, η λειτουργία αυτού του ενζύμου παρέμενε άγνωστη. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το ένζυμο αυτό, και το φυσιολογικό προϊόν της, το φωσφατιδικό οξύ, συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με φλεγμονές, καρκινική παθογένεια και νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Brown et al., 2017).

Συνολικά, διακρίνονται 48 ομόλογα της PEth, τα οποία έχουν αναγνωριστεί σε δείγματα αίματος. Τα ομόλογα που συναντιούνται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι η PEth 16:0/18:1 και η PEth 16:0/18:2 (Gnann et al., 2012). Οι εκτιμήσεις του χρόνου ημίσειας ζωής της PEth 16:0/18:1 και άλλων ομολόγων κυμαίνονται από 1 έως 13 ημέρες, αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής ποικίλλει σημαντικά και μεταξύ των ατόμων (Javors et al., 2016). Η μετα-ανάλυση που εκπονήθηκε από του Viel et al. αποδεικνύει ικανοποιητική αποτελεσματικότητα της PEth, σε κλινική πράξη, για την ανίχνευση χρόνιας και εκτενούς κατανάλωσης αλκοόλ (Viel et al., 2012). Η μεταβλητότητα στη φαρμακοκινητική της, ωστόσο, περιορίζει την ικανότητα αυτού του βιοδείκτη να προβλέπει την κατανάλωση αλκοόλ με οποιαδήποτε βεβαιότητα. Η επιλογή

μιας τιμής που να λειτουργεί ως κατώφλι περιπλέκεται από την έλλειψη οποιασδήποτε ποσοτικής φαρμακοκινητικής μέχρι και την πιο πρόσφατα δημοσιευμένη σχετική μελέτη (Dasgupta, 2015).



Σχήμα 9. Σχηματισμός της φωσφατιδυλοαιθανόλης από τη φωσφατιδυλοχολίνη, με τη δράση της φωσφολιπάσης D (Sonmez et al., 2017)

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των μοριακών ειδών PEth στο αίμα, μέσω μεθόδων φασματομετρίας υγρής χρωματογραφίας - πολλαπλής μάζας (LC-MS/MS). Στο αίμα που συλλέγεται από συστηματικούς πότες, αποδεικνύεται ότι τα κυρίαρχα ομόλογα της PEth, είναι οι PEth 16:0/18:1 και 16:0/18:2, μιας και αντιπροσωπεύουν κατά μέσο όρο το 37%-46% και το 26%-28%, αντίστοιχα, της ολικής PEth στο αίμα. Λόγω των παραλλαγών μεταξύ των ατόμων, ομόλογο PEth 16:0/18:2 ήταν μερικές φορές η κύρια μορφή, ενώ η PEth 16:0/20:4 αποτελούσε περίπου το 8%-13% της συνολικής PEth και η PEth 18:1/18:1 και 18:0/18:2 συνολικά αποτελούσαν περίπου το 11%-12% της συνολικής PEth. Τα είδη 16:0/16:0, 16:0/20:3, 18:0/18:1, 16:0/20:3 και 18:1/18:2 είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση στο αίμα, με το καθένα να αντιπροσωπεύει για περίπου 1%-5% του συνολικού PEth (Casati et al., 2019).

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της PEth εξαρτάται ειδικά από την αιθανόλη, η διαγνωστική εξειδίκευση της PEth ως βιοδείκτη της αιθανόλης, θεωρητικά αγγίζει το 100%. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ευαισθησία του έχει βρεθεί ότι φτάνει σε υψηλές τιμές, μεταξύ 94,5 και 100% (Høiseth, Bernard, et al., 2007). Η συγκέντρωση της PEth στο αίμα φαίνεται να μην επηρεάζεται από την ηλικία, το φύλο, και λοιπές ουσίες που λαμβάνονται, ή ασθένειες που δε συσχετίζονται με το αλκοόλ, όπως η υπέρταση, και ασθένειες των νεφρών και/ή του ήπατος.

Σε αντίθεση με το EtG ή το EtS, η PEth θεωρείται ότι δεν επηρεάζεται από τυχαία έκθεση σε αιθανόλη, όπως κάποιο στοματικό διάλυμα ή αντιβακτηριακά καθαριστικά χεριών (Høiseith, Bernard, et al., 2007; Shi et al., 2012). Η χρησιμότητά της για τη διάγνωση της κατάχρησης αλκοόλ καθορίζεται από τη βραχυπρόθεσμη φύση αυτού του δείκτη. Σε κλινικές μελέτες, η ένωση ήταν ανιχνεύσιμη στο αίμα ατόμων με ιστορικό χρόνιας και υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, έως και 28 ημέρες μετά από αποχή από το αλκοόλ (Shi et al., 2012).

Στην ανάλυση νεκροτομικών υλικών, ωστόσο, δεν είναι τόσο συχνή η χρήση της φωσφατιδυλοαιθανόλης ως δείκτη. Η ερευνητική ομάδα του Hansson, ελέγχοντας δείγματα αίματος από 85 περιστατικά, εξαιρώντας περιπτώσεις ανθρωποκτονίας, περιπτώσεις με προηγμένες σηπτικές εξεργασίες, καθώς και περιπτώσεις όπου ήταν δύσκολη η συλλογή αίματος, προσπάθησε να διερευνήσει την αναλυτική αξία της PEth (Hansson et al., 2001). Παρατηρήθηκε ότι ενώ η συγκέντρωση της αιθανόλης σε ορισμένα δείγματα ήταν μηδενική ή ασήμαντη, η συγκέντρωση φωσφατιδυλοαιθανόλης παρουσίαζε διακύμανση από 0,8 – 22,0 μmol/L. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για χρήσιμο βιοδείκτη διάγνωσης αλκοολικών ατόμων. Ωστόσο, προκειμένου να είναι ανιχνεύσιμη η ποσότητα PEth στο αίμα, θα πρέπει να καταναλώνονται καθημερινά, και για αρκετές μέρες, περίπου 50 g αιθανόλης.

Σε έρευνα που εκπονήθηκε αργότερα, χρησιμοποιώντας ως δείγμα τρίχες από την κεφαλή, οι συγκεντρώσεις της PEth που ανιχνεύτηκαν, ήταν μεταξύ 0,33 – 19,0 μmol/L, μικρότερες από εκείνες της προηγούμενης έρευνας σε δείγματα αίματος, που περιγράφηκε προηγουμένως. Ωστόσο, από τότε και έπειτα, ελαττώθηκε το όριο ποσοτικοποίησης της ανάλυσης, από τα 0,8 στα 0,22 μmol/L. Αυτό, όχι μόνο θα παρέτεινε το χρονικό παράθυρο για την ανίχνευση του PEth μετά από περιόδους αποχής από το αλκοόλ, αλλά κατέστησε επίσης δυνατό τον εντοπισμό χαμηλότερων επιπέδων πρόσληψης αιθανόλης (Bendroth et al., 2008).

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα, επιχειρήθηκε η ανάλυση ιστών του εγκεφάλου για ανίχνευση της φωσφατιδυλοαιθανόλης. Τα ευρήματα συμφωνούν με αυτά των προηγούμενων ερευνών, ωστόσο, δεδομένου του μικρού αριθμού περιστατικών που αξιοποιήθηκε (30 περιστατικά), καθώς και του γεγονότος ότι οι σωροί ανήκαν αποκλειστικά σε άντρες, αφήνει ένα αίσθημα επιφυλακτικότητας και την ανάγκη για περισσότερη έρευνα (Thompson et al., 2016).

Σημαντικό μειονέκτημα, ωστόσο, αποτελεί η παραγωγή φωσφατοδυλοαιθανόλης από την αιθανόλη που ήδη υπάρχει στο αίμα, όταν αυτό φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, ή στους -20 °C, και κατά συνέπεια να προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Κάτι τέτοιο

είναι δυνατόν να αποφευχθεί με την αποθήκευση των δειγμάτων στους -80 °C, ή χρησιμοποιώντας ξηρές κηλίδες αίματος (Dried Blood Spots, DBS) (Hartmann et al., 2007).

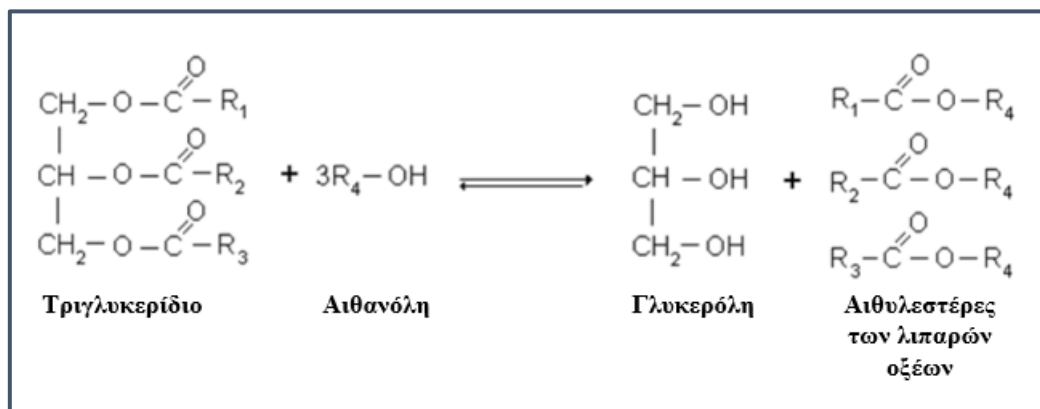
1.9.2 Αιθυλεστέρες των Λιπαρών Οξέων

Οι Αιθυλεστέρες των Λιπαρών Οξέων (FAEEs) είναι μια ομάδα αιθυλεστέρων που αποτελείται μεταξύ άλλων από μυριστικό αιθυλεστέρα, παλμιτικό αιθυλεστέρα, ελαϊκό αιθυλεστέρα και στεατικό αιθυλεστέρα. Ανιχνεύονται τόσο στο αίμα όσο και τα μαλλιά. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους στο αίμα είναι 16 ώρες, ενώ εξακολουθούν να είναι μετρήσιμοι 24 ώρες μετά την κατανάλωση αλκοόλ (Doyle et al., 1994), ακόμη και έως και 44 ώρες σε όσους είναι συστηματικοί πότες (Burucki et al., 2005). Στα μαλλιά, η ανίχνευση των FAEEs χρησιμεύει ως δείκτης για τη μακροχρόνια και έντονη κατανάλωση αλκοόλ. Ακόμη, ανιχνεύονται και στο επιθήλιο (Moore et al., 2003). Σημαντικό μειονέκτημά τους είναι ότι ακόμη και τα άτομα που απέχουν παντελώς από το αλκοόλ έχουν μικρές ποσότητες FAEEs στο αίμα και στα μαλλιά τους, καθώς οι FAEE φαίνεται να είναι ενδογενείς ουσίες (Auwärter et al., 2001; Ewa Czech, 2002; Maenhout et al., 2013).

Η ανίχνευση FAEEs στα μαλλιά χρησιμοποιείται συχνά στη μεταθανάτια ανάλυση για να προσδιοριστεί εάν υπήρξε υπερβολική πρόσληψη αλκοόλ έως και δύο εβδομάδες πριν από το θάνατο. Η ενσωμάτωση των FAEEs στα μαλλιά μπορεί να προκληθεί από τρεις πιθανές οδούς. Η πρώτη οδός θεωρείται ότι είναι η ενσωμάτωσή τους από το αίμα στα κύτταρα της ρίζας της τρίχας. Η δεύτερη οδός είναι ότι η αιθανόλη του αίματος διαχέεται στις ρίζες των μαλλιών και εκεί μεταβολίζεται σε εστέρες. Η τρίτη πιθανή οδός είναι ότι η αιθανόλη μεταβολίζεται σε αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων στους σμηγματογόνους αδένες, οι οποίοι και στη συνέχεια διαχέονται στα μαλλιά όταν απεκκρίνονται με το σμήγμα. Αναφέρεται ότι η δεύτερη και η τρίτη οδός είναι οι πιθανότερες (Auwärter et al., 2001).

Σε έρευνα των Burucki et al. σχετικά με το χρονικό διάστημα που είναι ανιχνεύσιμοι οι FAEEs, σε υγιή, κλινικά περιστατικά. Μέχρι τις πρώτες 24 ώρες, η συγκέντρωσή τους παρέμενε αναλλοίωτη. Ωστόσο, από τις επόμενες ώρες, η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται δραστικά, χωρίς να μηδενίζεται ή να φτάνει κοντά στο LOQ. Αυτό παρατηρείται ακόμη και έπειτα από τετραήμερη αποχή. Προτείνεται, από τους ίδιους, ότι υπάρχει ένα ελάχιστο εύρος που προκύπτει από τον φυσικό ανθρώπινο μεταβολισμό. Προκειμένου να οριστεί το εν λόγω εύρος, έγινε απόπειρα ανίχνευσης των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, περίπου 15 ώρες, από το τέλος της συνεδρίας κατανάλωσης αλκοόλ, που διήρκεσε 2,5 ημέρες. Αποδείχτηκε ότι

αν και η ευαισθησία των FAEEs σε αυτό το χρονικό σημείο ήταν ανώτερη από την ευαισθησία για την αιθανόλη (35% έναντι 0%, αντίστοιχα), η χρησιμότητά τους για τις δικαστικές επιστήμες, θεωρείται ανεπαρκής (Borucki et al., 2005).



Σχήμα 10. Σχηματισμός των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από την αντίδραση των τριγλυκεριδίων με την αιθανόλη. (Da et al., 2012)

Τη θεωρία που αποκλείει τη χρήση των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από τις τοξικολογικές αναλύσεις δικαστικού ενδιαφέροντος επιβεβαιώνει η πρόσφατη έρευνα των Liu et al. Μελετώντας τη σταθερότητα τεσσάρων πιθανών βιοδεικτών κατανάλωσης αιθανόλης (EtG, EtS, PHet και FAEEs) σε δείγμα αίματος που έχει ληφθεί μετά θάνατον, αποκάλυψαν ότι κατά τη συντήρηση του δείγματος σε διαφορετικές θερμοκρασίες, προκύπτουν τόσο ψευδώς θετικά, όσο και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Οι θερμοκρασίες ελέγχου ήταν 37 °C, 25 °C, 4 °C και -20 °C. Συνεπώς, αποκλείεται η χρήση τους στην διερεύνηση της προέλευσης της αιθανόλης στο πτώμα (Liu et al., 2018).

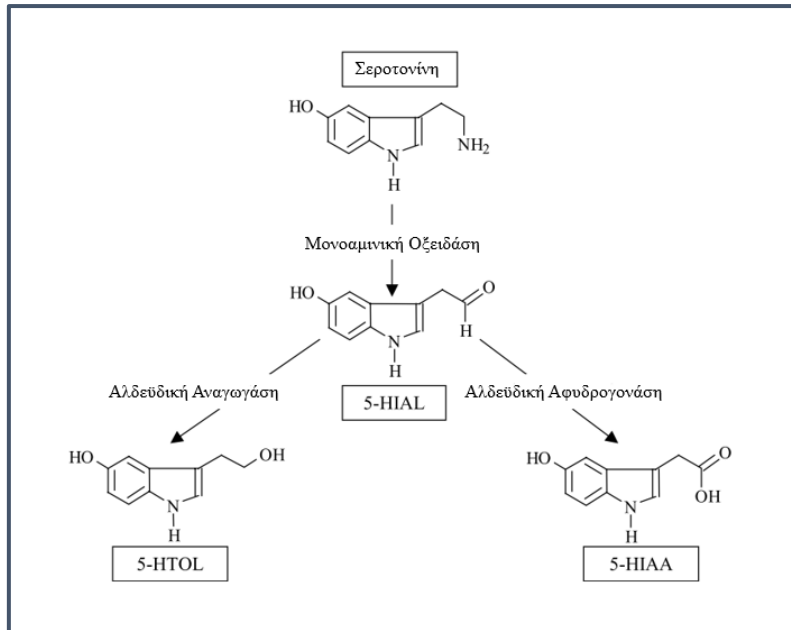
Η πιο πρόσφατη έρευνα σχετικά με την ικανότητα των FAEEs ως δείκτες κατανάλωσης αιθανόλης, δημοσιεύτηκε το 2020, από τους (Wang et al., 2020). Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιούνται οι dried blood spots, και γίνεται σύγκριση μεταξύ κλινικών και νεκροτομικών δειγμάτων. Στα κλινικά δείγματα, στις DBS που δημιουργήθηκαν από δείγμα ζώντων ανθρώπων, το επίπεδο των FAEEs αυξήθηκε στο 122,4%, στους 25 °C, και μειώθηκε στο 73,8% και 72,4% την τρίτη ημέρα αποθήκευσης στους -20 °C και 4 °C, αντίστοιχα. Στις κηλίδες που δημιουργήθηκαν από αίμα που προήλθε από νεκροτομή, τα επίπεδα των εστέρων αυξήθηκε στο 174,3%, 110,9% και 135,4%, την τρίτη ημέρα στους -20 °C, 4 °C και 25 °C. Στο ολικό αίμα, οι FAEEs επέδειξαν αστάθεια στους 4 °C και 25 °C, αλλά διατηρήθηκε σταθερή στους 20 °C, για 7 ημέρες (Liu et al., 2018). Όπως φαίνεται, η σταθερότητα των αιθυλεστέρων

των λιπαρών οξέων στις αποξηραμένες κηλίδες αίματος είναι κατώτερη, απ' ό τι στο ολικό αίμα (Wang et al., 2020).

1.9.3 5-Υδροξυ-τροπτοφόλη (5-HTOL)

Η 5-υδροξυ-τροπτοφόλη (5-HTOL) και το 5-υδροξυϊνδολ-3-οξικό οξύ (5-HIAA) είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνης (5-HT) και είναι γνωστό ότι είναι οι καλύτεροι βιοδείκτες για την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης, ενώ έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον στον τομέα της δικαστικής τοξικολογίας (Lorant & Nicaise, 2015).

Αρχικά, ο μεταβολισμός της σεροτινίνης περιλαμβάνει την αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης, σχηματίζοντας την ενδιάμεση αλδεϋδη, 5-υδροξυϊνδολο-3-ακεταλδεϋδη (5-HIAL). Η 5-HIAL οξειδώνεται από την αλδεϋδική αφυδρογονάση, σχηματίζοντας το 5-HIAA, τον κύριο μεταβολίτη της σεροτονίνης. Ακόμη, μπορεί να σχηματιστεί η 5-υδροξυ-τροπτοφόλη, που είναι δευτερεύοντας μεταβολίτης της σεροτονίνης. Σύμφωνα με αυτή τη μεταβολική οδό, η 5-HT ανάγεται από την αλκοολική αφυδρογονάση, και στη συνέχεια δέχεται την επίδραση της αλδεϋδικής αναγωγάσης. Ωστόσο, η κατανάλωση αιθανόλης έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε σημαντικά ενισχυμένη παραγωγή 5-HTOL και μειώνει τον σχηματισμό 5-HIAA καθώς τα ένζυμα ALDH και ADH είναι κοινά τόσο στον μεταβολισμό της αλκοόλης όσο και στον σχηματισμό 5-HIAA και 5-HTOL από το 5-HT. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης αυξάνει την αναλογία NADH/NAD⁺ στον οργανισμό, όπως και την παραγωγή 5-HTOL, μειώνοντας, αντίστοιχα, το 5-HIAA. Συνεπώς, αυξάνεται η μετρούμενη αναλογία 5-HTOL/5-HIAA. Αυξημένες τιμές της αναλογίας σε ανάλυση ούρων (>15 pm/nm), αποτελούν σαφή ένδειξη οξείας κατανάλωσης αλκοόλ πριν από το θάνατο (Farke & Anderson, 2007).



Σχήμα 11. Μετατροπή της σεροτονίνης σε 5-υδροξυ-τρυπτοφόλη και 5-υδροξυϊνδολ-3-οξικό οξύ

Η 5-υδροξυτρυπτοφόλη (5-HTOL), επομένως, είναι ένας έμμεσος δείκτης της κατανάλωσης αλκοόλ. Η κανονική αναλογία στο αίμα μεταξύ 5-HTOL και 5-HIAA, είναι 0,007 - 0,01, αλλά μετά την πρόσληψη αιθανόλης η αναλογία αυξάνεται σε 0,4 - 0,5. Η αιθανόλη είναι υπεύθυνη για αυτή την αύξηση της αναλογίας, επειδή η ακεταλδεϋδη, η οποία είναι προϊόν αποικοδόμησης της αιθανόλης, μεταβολίζεται από την αλδευδική αφυδρογονάση και επομένως ανταγωνίζεται την 5-υδροξυϊνδόλη ακεταλδεϋδη (Robert D. Johnson et al., 2005).

Η αναλογία 5-HTOL/5-HIAA είναι αυξημένη στο αίμα τέσσερις έως επτά ώρες μετά το τέλος της πρόσληψης αλκοόλ και έως και ογδόντα ώρες αυτό είναι ακόμα ανιχνεύσιμο. Σε περιπτώσεις οξείας κατανάλωσης αλκοόλ, η προκείμενη αναλογία παραμένει σημαντικά αυξημένη για 11-19 ώρες, από την κατάποση (Robert D. Johnson et al., 2005). Αν και το 5-HTOL και το 5-HIAA είναι προϊόντα αποδόμησης της σεροτονίνης, η πρόσληψη τροφών πλούσιων σε σεροτονίνη και εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης δεν επηρεάζει αυτή την αναλογία. Το μειονέκτημα της χρήσης της αναλογίας 5-HTOL/5-HIAA ως δείκτη κατανάλωσης αιθανόλης είναι ότι η αναλογία είναι δύσκολο να ερμηνευτεί και επομένως δεν είναι πολύ χρήσιμο στη διάκριση μεταξύ κοινωνικής και υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ (Hannuksela et al., 2007; Robert D. Johnson et al., 2005).

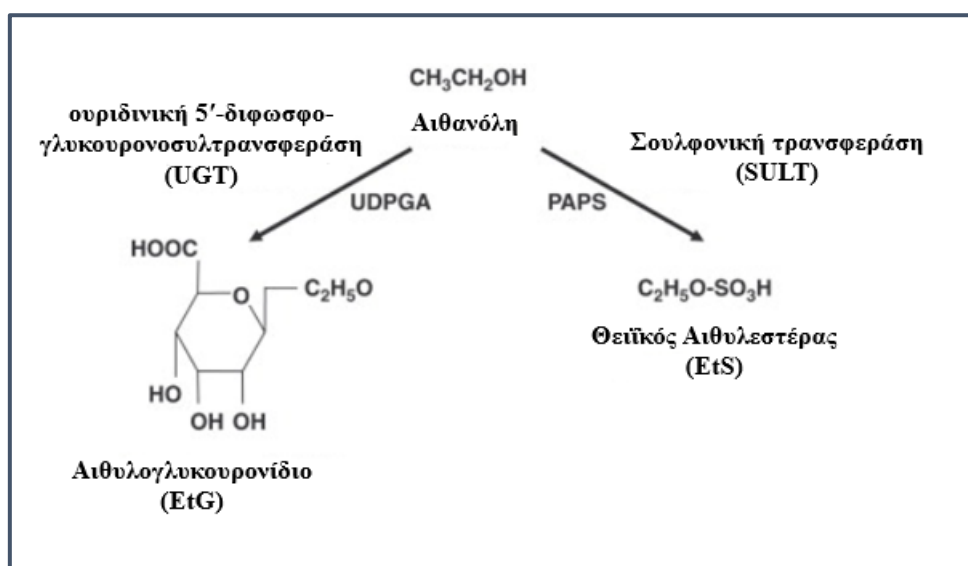
Το αναλυτικό εργαλείο που αξιοποιείται σε αυτήν την περίπτωση είναι η Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LC-MS), ή και η LC/MS/MS. Ειδικά για την τελευταία, η ερευνητική ομάδα των Johnson et al, ανέπτυξε μια μέθοδο ταυτόχρονης ανάλυσης των μεταβολιτών 5-HTOL και 5-HIAA, σε δείγματα ούρων, που ελήφθησαν από θύματα αεροπορικού δυστυχήματος. Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με υγρή/υγρή εκχύλιση, και ανάλυση LC/MS/MS και LC/MS/MS/MS. Ακόμη, στην ίδια έρευνα, τέθηκε ένα νέο κατώφλι ανίχνευσης των μεταβολιτών, κατώτερο από το προηγούμενο στα 15 pmol/nmol (R. D. Johnson et al., 2004). Σε τέσσερις από τις πέντε περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η ανιχνευθείσα αιθανόλη αποδείχθηκε ότι ήταν παρούσα λόγω μεταθανάτιου μικροβιακού σχηματισμού και όχι κατανάλωσης, παρόλο που μπορεί να υπήρχε κάποια ένδειξη κατανάλωσης αιθανόλης (Robert D. Johnson et al., 2005). Στην πιο πρόσφατη έρευνα που βρέθηκε στη βιβλιογραφία, η ταυτόχρονη ανίχνευση των 5-HTOL και 5-HIAA στο LC/MS πραγματοποιήθηκε, χωρίς την παραγωγή της μητρικής ένωσης. Οι ίδιοι προτείνουν πως με αυτήν την αναλογία, ως ένας εξαιρετικά ευαίσθητος και ειδικός βιοδείκτης της πρόσφατης πρόσληψης αλκοόλ, μπορεί κανείς να αποδείξει ή να διαψεύσει την προθανάτια κατανάλωση αλκοόλ και να βοηθήσει με σιγουριά στην ανάλυση όλων των θετικών σε αιθανόλη θύματα αεροπορικού δυστυχήματος, να ερμηνεύσει τις υψηλές τιμές και να μειώσει τα ψευδώς θετικά που προκύπτουν από τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (Santhosh et al., 2021).

1.9.4 Αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG) και Θεϊικός Αιθυλεστέρας (EtS)

Το αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG) και οι θεϊκός αιθυλεστέρας (EtS), είναι πολικοί μεταβολίτες της αιθανόλης και χρησιμοποιούνται ευρέως στον κλάδο της δικαστικής τοξικολογίας, ως δείκτες προθανάτιας κατανάλωσης της αιθανόλης. Οι τεχνικές ανάλυσής τους είναι, σχετικά, απλές, με αποτέλεσμα η ανίχνευση των εν λόγω ενώσεων είναι εύκολη και αξιόπιστη. Εξίσου σημαντικό είναι ότι αυτοί οι μεταβολίτες σχηματίζονται από την αιθανόλη, δεν επηρεάζονται από ηπατικές νόσους, και εντοπίζονται σε πληθώρα βιολογικών δειγμάτων και ιστών (Krabseth et al., 2014; Santunione et al., 2018a). Καμία προηγούμενη μελέτη δεν διαπίστωσε ότι το EtG μπορεί να σχηματιστεί μετά τον θάνατο (Høiseth et al., 2008) και το EtS είναι γνωστό ότι είναι σταθερό ακόμη και υπό σοβαρή σήψη. Και οι δύο αναλυόμενες ουσίες μπορούν να μετρηθούν σε πτώματα, ενώ έχουν ανιχνευθεί ακόμη και μετά την παρέλευση 27 ετών από τον θάνατο (Politi et al., 2008).

Η αιθανόλη, ή ο μεταβολίτης της ακεταλδεΐδη, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλάκις ως άμεσοι βιοδείκτες της κατάποσης αιθανόλης πριν από το θάνατο (Pronko et al., 1997; Vezzoli et al., 2015). Το EtG και το EtS είναι βιοδείκτες της προθανάτιας κατανάλωσης αλκοόλ και χρησιμοποιούνται επίσης για τη δοκιμή μεταθανάτιων τοξικολογικών δειγμάτων. Οι EtG και EtS σχηματίζονται με γλυκουρονίωση και θείωση της αιθανόλης και φτάνουν σε μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα 3–5 ώρες μετά τη λήψη αιθανόλης. Το EtG και το EtS είναι αμφοτέρα μη πτητικά, σταθερά και υδατοδιαλυτά. Η συγκέντρωσή τους στα ούρα φτάνει στο μέγιστο περίπου 22-48 ώρες μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Ο σχηματισμός της EtG μετά τη σύζευξη με το γλυκουρονικό οξύ καταλύεται από την ουριδινική 5'-διφωσφο-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση.

Η απουσία του EtG από κάποιο δείγμα, θα μπορούσε να αποδοθεί, συν τοις άλλοις, και στη μεταθανάτια διάσπασή του. Μολαταύτα, η παρουσία του, μαζί με το EtS, αποτελούν ακλόνητο στοιχείο για την κατανάλωση αλκοόλ προθανάτια. Μερικοί άνθρωποι δεν είναι σε θέση να σχηματίσουν EtG λόγω μειωμένης δραστηριότητας του ενζύμου ουριδινική 5'-διφωσφο-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση, το οποίο εμφανίζεται στο σύνδρομο Gilbert και επίσης σε σπάνιες περιπτώσεις του συνδρόμου Crigler-Najjar τύπου 1. Ακόμη, δεν έχουν ταυτοποιηθεί ασθένειες που επηρεάζουν τη διαδικασία της θείωσης, και η έλλειψη σχηματισμού τόσο EtG όσο και EtS είναι λιγότερο πιθανό να συμβεί (Krabseth et al., 2014).



Σχήμα 12. Χημικές αντιδράσεις των μετατροπών της αιθανόλης σε αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG) και θειϊκό αιθυλεστέρας (EtS) (Song et al., 2015)

Τα δείγματα που εξετάζονται στο εργαστήριο μπορεί να είναι το αίμα, οι τρίχες, τα ούρα, το υαλοειδές υγρό, ακόμη και ιστοί, καθώς εκεί παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με την αιθανόλη (Biondi et al., 2019; Ferraguti et al., 2017). Επιπλέον, οι προκείμενοι δείκτες της εν ζώη κατανάλωσης αιθανόλης χαρακτηρίζονται από την ευαισθησία και την εκλεκτικότητά τους, σε σύγκριση με άλλους βιοχημικούς δείκτες (Casati et al., 2019). Χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να αποβληθούν από το σώμα. Η EtG, για παράδειγμα, φτάνει στη μέγιστη συγκέντρωσή της στο αίμα μετά από 4 ώρες, με διάμεσο χρόνο ημίσειας ζωής τις 2,2 ώρες (Santunione et al., 2018b). Ωστόσο, η χρήση μόνο του EtG ως ένδειξη πρόσληψης αλκοόλ μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, επειδή μπορεί να αποικοδομηθεί σε μεταθανάτια δείγματα λόγω προηγμένων σηπτικών εξεργασιών. Για το λόγο αυτό, το EtS χρησιμοποιείται παράλληλα με το EtG γιατί είναι πιο σταθερό και αξιόπιστο. Συνεπώς, και οι δύο βιοδείκτες θα πρέπει να ελέγχονται σε περιπτώσεις προηγμένης σήψης (Hegstad et al., 2017).

Τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν απευθείας ή μπορεί να απαιτείται η προκατεργασία τους. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των βιοδεικτών αιθανόλης EtG και EtS. Η υγρή χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass spectrometry) (LC-MS/MS) είναι μια από τις πιο ακριβείς και ευαίσθητες μεθόδους. Αρχικά, για την ανάλυση δείγματος αίματος που προέρχεται από αυτοψία, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο LC/MS, το οποίο εφαρμόζονταν σε αντίστοιχες αναλύσεις σε αίμα κλινικών περιστατικών (Høiseth et al., 2008). Αυτή η εφαρμογή αποδείχθηκε ευαίσθητη, με τιμές ορίου ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 0,02 και 0,09 mg/L, αντίστοιχα. Την εποχή εκείνης της εργασίας, τα matrix effects και η σημασία της ανάλυσης του EtS παράλληλα με το EtG δεν είχαν ακόμη ληφθεί υπόψη. Επιπλέον, το LC-MS δεν ήταν η εξέχουσα αναλυτική διαδικασία στην δικαστική τοξικολογία σε σύγκριση με το GC-MS και η βιβλιογραφία περιείχε λίγες μελέτες σχετικά με τους βιοδείκτες αιθανόλης, ενώ δεν είχαν μελετηθεί οι σταθερότητες της EtG. Επίσης, τα matrix effects δεν θεωρήθηκαν σημαντικές παράμετροι στην επικύρωση της μεθόδου, όπως φαίνεται από τις οδηγίες της Εταιρείας Εγκληματολογικών Τοξικολόγων (SOFT)/American Academy of Forensic Sciences (AAFS), για παράδειγμα (SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guideline., 2006). Σε μελέτη των (Høiseth et al., 2008) το EtG ανιχνεύθηκε στο αίμα σε 19 από τις 39 περιπτώσεις αυτοψίας. Η πρόθεση σε αυτή τη μελέτη ήταν να εξεταστεί η εγκυρότητα της χρήσης EtG ως βιοδείκτη αιθανόλης για την προθανάτια κατανάλωση σε πραγματικά δείγματα περιστατικών και σε περιπτώσεις που ήταν θετικές για EtG, και να μελετηθεί εάν το EtG σχηματίστηκε μετά τον

θάνατο σε οποιαδήποτε από τις αρνητικές περιπτώσεις. Τελικά, σχηματίστηκε σε 20 περιπτώσεις.

Σε προηγούμενη αναφορά των ίδιων συγγραφέων, 93 αποθανόντες αναφέρθηκαν ότι είχαν ιστορικό προθανάτιας κατάποσης αλκοόλ. Αυτές οι αναφορές υποστηρίχθηκαν από θετικά αποτελέσματα EtG σε όλες τις περιπτώσεις, ακόμη και αν σημειωνόταν χαμηλή συγκέντρωση αλκοόλ στο αίμα. Επιπλέον, δείγματα από 53 αποθανόντες χωρίς ιστορικό χρήσης αλκοόλ ήταν όλα αρνητικά για EtG. Στις θετικές περιπτώσεις EtG, το εύρος της EtG στο αίμα (93 περιπτώσεις) κυμαινόταν από 0,11 έως 56 mg/L. Η διάμεση συγκέντρωση της EtG στο αίμα ήταν 0,48 mg/L (εύρος 1,2–40 mg/L) σε περιπτώσεις με υψηλό BAC και ιστορικό κατάποσης αλκοόλ (41 περιπτώσεις). Στη δεύτερη ομάδα, η οποία είχε ιστορικό χρήσης αλκοόλ και την ενδιάμεση συγκέντρωση BAC (40 περιπτώσεις), η διάμεση συγκέντρωση EtG ήταν 3,6 mg/L (εύρος 0,5–56 mg/L). Στις τελευταίες 12 περιπτώσεις, που είχαν χαμηλή BAC και ιστορικό χρήσης αλκοόλ, η διάμεση συγκέντρωση EtG ήταν 0,77 mg/L (εύρος 0,11–4 mg/L) (Høiseth, Karinen, et al., 2007b). Σε αυτές τις μελέτες, η EtG επιβεβαιώθηκε ότι είναι ένας αξιόπιστος βιοδείκτης για την προθανάτια κατάποση αλκοόλ. Ωστόσο, δεν ήταν σταθερή υπό ορισμένες συνθήκες. Ως εκ τούτου, επιπρόσθετοι βιοδείκτες αιθανόλης, παρόμοιοι με το EtG, αλλά πιο σταθεροί κάτω από περιβαλλοντικές συνθήκες, αναζητήθηκαν για μεταθανάτιες ιατροδικαστικές και τοξικολογικές έρευνες. Ένας τετραπολικός αναλυτής LC-MS μπόρεσε να παράσχει εύλογα δεδομένα για το EtG σε μια μεταθανάτια έρευνα αλκοόλ, οδηγώντας στη χρήση πιο προηγμένων τεχνικών LC-MS/MS με υψηλότερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Ωστόσο, λόγω του υψηλού κόστους του LC-MS/MS εκείνη την εποχή το 2007, λίγα εγκληματολογικά εργαστήρια μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν αυτήν την τεχνική σε εγκληματολογικές μεταθανάτιες έρευνες.

Οι Thierauf et al. διεξήγαγαν μελέτη χρησιμοποιώντας μια παρόμοια διαδικασία LC-MS/MS με αυτή που αναφέρθηκε από τους (Weinmann et al., 2004) και (Schloegl et al., 2006a) και προσδιόρισε το EtG και το EtS σε μεταθανάτια δείγματα αίματος που ελήφθησαν από 26 περιπτώσεις (εύρος BAC 346–700 mg/dL). Σε αυτές τις περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκε κανένα σημάδι σήψης λόγω του κρύου καιρού, καθώς και λόγω της άμεσης εναπόθεσής τους στο ψυγείο. Ωστόσο, ορισμένα από τα πτώματα είχαν χρονική περίοδο μεταξύ θανάτου και δειγματοληψίας έως και 9 ημέρες. Στην έρευνα αυτή, βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα EtG σε 25 από τις 26 περιπτώσεις, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,35 έως 19,3 mg/L. Εν τω μεταξύ, το EtS βρέθηκε να είναι αρνητικό σε 2 από τις 26 περιπτώσεις, με συγκεντρώσεις, σε περιπτώσεις θετικές σε EtG, που κυμαίνονται από 0,13 έως 4,9 mg/L. Η διάμεση αναλογία

συγκέντρωσης αλκοόλ στα ούρα (UAC)/BAC ήταν 1,4 (εύρος : 0,4–1,8). Οι διάμεσοι λόγοι EtG αίματος/EtS αίματος, EtG/BAC αίματος και EtS/BAC αίματος ήταν 2,3 (εύρος : 0,3–6,3), 2,5 (εύρος : 0,3–19,3) και 0,9 (εύρος : 0,4–4,5), αντίστοιχα. Οι συσχετίσεις μεταξύ βιοδεικτών BAC και αιθανόλης υπολογίστηκαν και βρέθηκαν φτωχές, για EtG/BAC αίματος και EtS/BAC αίματος. (Thierauf et al., 2011).

Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με μέθοδο φασματομετρίας μάζας διαδοχικού ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (UPLC–ESI-MS/MS) που αναφέρεται από τους (Høiseith et al., 2009) υιοθετήθηκε από τους (Krabseth et al., 2014). Το EtG και το EtS αναλύθηκαν εφαρμόζοντας λειτουργία MRM και αρνητικού ιόντος. Αυτή η εφαρμογή αποδείχθηκε ευαίσθητη, με τιμές LOD 0,02 και 0,013 mg/L για EtG και EtS. ενώ, το LOQ βρέθηκε να είναι 0,06 mg/L για το EtG και 0,028 mg/L για το EtS. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 493 πτώματα θετικά σε αιθανόλη και 60 περιπτώσεις βρέθηκαν αρνητικά για EtS (12%). Σε αυτήν τη μελέτη, το 38% των συνολικών περιπτώσεων που είχαν BAC \leq 54 mg/dL θεωρήθηκε ότι είχαν μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης, ενώ μόνο το 2,2% των περιπτώσεων που είχαν BAC \geq 55 mg/dL, θεωρήθηκε θετικά για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης. Η διάμεση ποσότητα EtG και EtS στο αίμα ήταν 9,5 $\mu\text{mol/L}$ (εύρος : nd – 618) και 9,2 $\mu\text{mol/L}$ (εύρος : nd – 183), αντίστοιχα, ενώ η διάμεση τιμή BAC ήταν 120 mg/dL (εύρος: 10– 490 mg/dL) στο σύνολο των περιπτώσεων ενώ αυτό ήταν 30 mg/dL (εύρος 10–99 mg/dL) στις 60 περιπτώσεις που εξετάστηκαν αρνητικά για EtS. Μια θετική συσχέτιση μεταξύ BAC και EtG υποδεικνύεται από το rho του Spearman = 0,671 με το rho του Spearman = 0,670 για το BAC και το EtS. Αυτό συμφωνεί με μια προηγούμενη μελέτη που πρότεινε ότι η πιθανότητα σχηματισμού νέας αλκοόλης αυξήθηκε με χαμηλότερες συγκεντρώσεις BAC (Levine et al., 1993).

Μια πρόσφατη μελέτη των Al-Asmari και Almouidi, διερεύνησε τις συγκεντρώσεις EtG και EtS σε δείγματα αίματος χρησιμοποιώντας τριπλό τετράπολο LC–ESI/MS, σε λειτουργία MRM και αρνητικού ιόντος. Η έκλυση των αναλυτών ήταν πολύ γρήγορα (λιγότερο από 2 λεπτά). Το LOD κυμαινόταν από 0,05–0,06 mg/L για αναλύτες ενδιαφέροντος. Τα LOQ ήταν 0,075 mg/L τόσο για το EtG όσο και για το EtS. Τα matrix effects για EtG και EtS παρατήρησαν μια τιμή ενίσχυσης ιόντων που κυμαίνεται από 103 έως 147%, και οι αναλυτικές ανακτήσεις κυμαίνονταν από 72 έως 100%. Αυτή η επικυρωμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως ανάλυση ρουτίνας σε 592 μεταθανάτιες περιπτώσεις, με σκοπό να γίνει διάκριση μεταξύ της καταναλωθείσας αιθανόλης, και αυτής που παρήχθη μεταθανάτια. Η διάμεση BAC στα δείγματα αίματος στις περιπτώσεις προθανάτου αλκοόλ ήταν 138 mg/dL

(εύρος : 11–537 mg/dL), η διάμεση συγκέντρωση EtG στο αίμα ήταν 3 mg/L (εύρος : 1–156 mg/L) και η διάμεση τιμή αίματος Η συγκέντρωση EtS ήταν 2 mg/L (εύρος : 0,3–99 mg/L). Τα BAC, EtG και EtS αναφέρθηκαν σε περιπτώσεις που είχαν κάποια σημάδια σήψης (5 περιπτώσεις), ενώ μόνο το BAC μετρήθηκε σε περιπτώσεις βαριάς σήψης (7 περιπτώσεις). Η παράλληλη χρήση του EtG και του EtS βρέθηκε ότι παρέχει ακριβή αποτελέσματα για τη διάκριση μεταξύ προθανάτων και μεταθανάτων πηγών BAC. Πέντε δείγματα ήταν θετικά μόνο για EtG και EtS και αρνητικά για αιθανόλη και 27 περιπτώσεις ήταν θετικά για αιθανόλη, EtG και EtS (Al-Asmari & Al-Amoudi, 2020).

Σε περιπτώσεις που το αίμα δεν είναι διαθέσιμο ως βιολογικό δείγμα, εξαιτίας τραύματος, αιμορραγίας ή αποσύνθεσης, επιλέγονται τα ούρα. Μερικές μελέτες ανέφεραν μόνο EtG σε μεταθανάτια ανάλυση ούρων (Høiseth et al., 2008; Ketten et al., 2009; Santunione et al., 2018a; Schloegl et al., 2006a) και μια μεμονωμένη μελέτη ανέφερε μόνο EtS σε ούρα (Esteve-Turrillas et al., 2006), ενώ πολλές μελέτες ανέφεραν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της EtG και της EtS σε ανάλυση ρουτίνας μετά θάνατον ούρων από 2006 (Al-asmari et al., 2010; Al-Asmari & Al-Amoudi, 2020; Bicker et al., 2006; Høiseth & Karinen, 2010; Thierauf et al., 2011). Οι πρώτες μελέτες διαπίστωσαν ότι τα ούρα είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση EtG σε σύγκριση με άλλα σωματικά υγρά και ιστούς (Høiseth, Karinen, et al., 2007a; Schloegl et al., 2006b).

Οι ανέφεραν μια πλήρως επικυρωμένη διαδικασία LC–ESI/MS για την ανάλυση 21 δειγμάτων διαφόρων μεταθανάτιων δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων των ούρων. Το LOQ ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με προηγούμενες αναφορές (Ketten et al., 2009) και αναφέρθηκε ότι ήταν 0,5 mg/L. Σε 13 από τις 21 περιπτώσεις, ήταν διαθέσιμα δείγματα ούρων για μέτρηση EtG. Η διάμεση συγκέντρωση EtG ούρων ήταν 22 mg/L (εύρος : 2–373 mg/L) και η διάμεση αναλογία μεταξύ των συγκεντρώσεων EtG ούρων και EtG αίματος ήταν 19,2 φορές (εύρος : 2–104) (Santunione et al., 2018a). Σε μια άλλη μελέτη των (Schloegl et al., 2006b) Οι συγκεντρώσεις EtG ούρων κυμαίνονταν από 15 έως 509 mg/L, με μέση συγκέντρωση 81 mg/L και την αναλογία των συγκεντρώσεων EtG ούρων/EtG αίματος 15 φορές (εύρος : 6–31). Παρόμοιες αναλογίες αναφέρθηκαν επίσης από τους (Ketten et al., 2009), οι οποίοι εμφάνισαν διάμεση αναλογία 18,6 φορές (εύρος : 3–142) και υψηλότερη μέση συγκέντρωση EtG στα ούρα 43 mg/L (εύρος : 0,3–632 mg/L).

Οι Al-Samari και Al-Amoudi ανέλυσαν δείγματα ούρων για τον προσδιορισμό των EtG και EtS. Το LOD των EtG και EtS ήταν 0,05 mg/L και το LOQ ήταν 0,075 mg/L. Οι καμπύλες γραμμικής βαθμονόμησης για τα EtG και EtS καθιερώθηκαν στο εύρος των 0,05–4 mg/L. Σε

αυτή τη μελέτη, δείγματα ούρων που ελήφθησαν από 32 αυτοψίες δοκιμάστηκαν για βιοδείκτες αιθανόλης, σε αυτές τις περιπτώσεις, η διάμεση UAC ήταν 125 mg/dL και η μέση UAC ήταν 203 mg/dL (εύρος : 10–1180 mg/dL). Όλες εκτός από οκτώ περιπτώσεις ήταν διαθέσιμες για δοκιμές EtG και EtS, οι οποίες είχαν διάμεσες συγκεντρώσεις 52 mg/L (εύρος : 2–685 mg/L) και 22 mg/L (εύρος : 3–155 mg/L), αντίστοιχα. Τα ούρα συνήθως δεν είναι διαθέσιμα στις περισσότερες περιπτώσεις που περιλαμβάνουν σύνθεση αιθανόλης, και ήταν διαθέσιμα μόνο για το ένα τρίτο των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Οι αναλογίες UAC/BAC υπολογίστηκαν σε πολλές ομάδες δειγμάτων για να διερευνηθεί η χρησιμότητά τους στη διάκριση μεταξύ της προθανάτιας κατανάλωσης αλκοόλ και της μεταθανάτιας σύνθεσης αλκοόλ. Στην πραγματικότητα, πολλά τεστ UAC ήταν θετικά παρά τα κρούσματα που ταξινομήθηκαν ως οφειλόμενα σε μεταθανάτια παραγωγή. Αντίθετα, οι αναλογίες UAC/BAC σε περιπτώσεις σήψης και μη σήψης δεν μπορούσαν να διακριθούν, λόγω των χαμηλών BAC και UAC. Επομένως, το EtG και το EtS είναι οι δείκτες επιλογής για τον προσδιορισμό της προθανάτιας κατανάλωσης αλκοόλ. Στην ίδια μελέτη, λήφθηκαν υψηλότεροι λόγοι συγκεντρώσεων UAC/BAC από τον αναμενόμενο (1/3) για επιβεβαιωμένες περιπτώσεις προθανάτιας κατανάλωσης αιθανόλης για τις οποίες προτάθηκε η παρουσία προθανάτιων και μεταθανάτιων πηγών αλκοόλης. Οι συγκεντρώσεις EtG και EtS σε περιπτώσεις στις οποίες το αλκοόλ ήταν το μόνο φάρμακο που ανιχνεύθηκε ήταν υψηλότερες από τις περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκε αλκοόλ μαζί με άλλα φάρμακα. Οι μέσες συγκεντρώσεις ήταν 193 mg/L (εύρος : 18–649 mg/L) και 110 mg/L (εύρος : 2–475) για το EtG και 43 mg/L (εύρος : 3–155 mg/L) και 29 mg/L (εύρος : 3–124 mg/L) για EtS, αντίστοιχα. Επιπλέον, σε περιπτώσεις που ήταν θετικές για προθανάτιο αλκοόλ, οι συγκεντρώσεις EtG και EtS ήταν υψηλότερες από ό,τι σε περιπτώσεις που εμφάνισαν κάποια σημεία σήψης σε σύγκριση με περιπτώσεις χωρίς σήψη. Οι διάμεσες συγκεντρώσεις ήταν 257 mg/L (εύρος : 34–445 mg/L) και 126 mg/L (εύρος : 2–649 mg/L) για το EtG, ενώ οι συγκεντρώσεις EtS ήταν 95 mg/L (εύρος : 3–156 mg/L) και 21 (εύρος : 3–124 mg/L), αντίστοιχα. (Al-Asmari & Al-Amoudi, 2020).

Οι Al-Asmari & Al-Amoudi, 2020 δήλωσαν ότι η συσχέτιση του BAC ή του UAC τόσο με το EtG όσο και με το EtS ήταν συχνά φτωχή, κάτι που υποστηρίχθηκε από προηγούμενες αναφορές (Al-asmari et al., 2010; Bicker et al., 2006). Με παρόμοιο τρόπο, αναλογίες UAC/BAC που ήταν υψηλότερες από το αναμενόμενο βρέθηκαν σε 52 δείγματα ούρων που ελήφθησαν από μεταθανάτιες περιπτώσεις, με μέσο όρο και διάμεσο 2 και 1 (0,5–22) (Bicker et al., 2006). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις αναλογίες συγκέντρωσης EtG/EtS στα ούρα

μεταξύ ομάδων περιπτώσεων που ταξινομούνται ως αλκοόλ μόνο, αλκοόλ με άλλα φάρμακα, μη σήψης και κάποια σήψη.

Το 2006, οι (Schloegl et al., 2006a) εξέτασαν εννέα δείγματα ούρων και μεταθανάτιους ιστούς (ήπαρ, σκελετικός μυς) με LC-MS/MS, ώστε να καθοριστεί η σταθερότητα του EtG. Οι συγκεντρώσεις EtG ήταν σταθερές όταν αποθηκεύονταν στους 4 °C σε αεροστεγείς δοκιμαστικούς σωλήνες, αλλά όταν αποθηκεύτηκαν σε αεριζόμενα φιαλίδια για 5 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου, οι συγκεντρώσεις EtG μεταβλήθηκαν εντός ενός εύρους, που περιγράφεται από μείωση κατά 30%, με την επακόλουθη αύξηση κατά 80%. Οι μεταθανάτιες συγκεντρώσεις του EtG στους ιστούς μειώθηκαν κατά 27,7% όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 4 εβδομάδες, αλλά ήταν ακόμα ανιχνεύσιμα. Τα αποθηκευμένα δείγματα ούρων στους 4 °C σε αεροστεγείς δοκιμαστικούς σωλήνες έδειξαν ελαφρές αλλαγές στη συγκέντρωση EtG που κυμαίνονταν από -12 έως 32%. Μεγαλύτερες διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις EtG όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (22–27 °C) σε αεριζόμενα φιαλίδια που κυμαίνονται από -30 έως + 83%.

Σε μια άλλη μελέτη, τα δείγματα αίματος αποθηκεύτηκαν σε εύρος θερμοκρασιών 30 – 40 °C, χωρίς συντηρητικά. Το EtG βρέθηκε εξαιρετικά ασταθές σε αυτές τις συνθήκες, αλλά όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με φθοριούχο κάλιο (KF) ως συντηρητικό, το EtG ήταν σταθερό. Δεν σημειώθηκε νέος σχηματισμός EtG όταν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 30 °C, ακόμη και χωρίς συντηρητικά, ή σε θερμοκρασία δωματίου με φθοριούχο κάλιο. Σε 15 περιπτώσεις ρουτίνας στις οποίες το EtG αίματος ήταν αρνητικό και η αιθανόλη που ανιχνεύτηκε υποτίθεται ότι ήταν ενδογενής, έξι περιπτώσεις ήταν θετικές για EtG στα ούρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, πιθανώς ελήφθη αιθανόλη και το αρνητικό αποτέλεσμα EtG στο αίμα μπορεί να ήταν μια ψευδώς αρνητική ανίχνευση λόγω της αποδόμησης κατά τη σήψη (Høiseth et al., 2008).

Σε *in vitro* πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν από τους (Baranowski et al., 2008) με βακτηριακές αποικίες *E. coli*, *K. pneumoniae* και *Clostridium sordellii*, απομονωμένες από δείγματα αυτοψίας (ήπαρ, καρδιακό αίμα, ούρα, ασκίτης, περικαρδιακό υγρό, υπεζωκοτικό υγρό) και αναλύθηκαν για τη δραστηριότητα της β-γλυκουρονιδάσης. Τα τρία βακτηριακά στελέχη προστέθηκαν σε ένα μέσο με έλλειψη θρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των EtG, EtS ή και των δύο και επώαστηκαν στους 36 ± 1 °C. Τα δείγματα ελήφθησαν μετά από διαφορετικούς χρόνους έως και 11 ημέρες και τα EtS και EtG μετρήθηκαν με LC-ESI-

MS/MS. Παρατηρήθηκε ολική αποικοδόμηση του EtG, με το *E. coli* και το *C. sordellii* σε 3-4 ημέρες, αλλά το EtS δεν επηρεάστηκε κατά τη διάρκεια των 11 ημερών επώασης. Αποδείχθηκε και εδώ, ότι το EtG είναι ασταθές στο αίμα σε θερμοκρασίες γύρω στους 30-40 °C λόγω βακτηριακής αποικοδόμησης, ωστόσο είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου εάν προστεθεί φθοριούχο κάλιο ως συντηρητικό.

Ο σχηματισμός του EtS καταλύεται από τις σουλφοτρανσφεράσες. Σε μελέτες όπου το EtG αποικοδομείται έπειτα από βακτηριακή δραστηριότητα, το EtS δε φαίνεται να επηρεάζεται. Αυτό το εύρημα δείχνει ότι η ανάλυση μόνο του EtG θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ο συνδυασμός ανάλυσης EtG με ανάλυση EtS είναι δυνατός με LC-MS/MS. Σε μια προηγούμενη αναφορά, ο χρόνος κατανάλωσης αλκοόλ μπορεί να εκτιμηθεί ότι είναι εντός 1-2 ωρών από τη συλλογή δειγμάτων αίματος, εάν η αναλογία μεταξύ BAC (mg/g) και συγκέντρωσης EtG (mg/l) είναι υψηλότερη από 1,0, ενώ εάν αυτή η αναλογία είναι μικρότερο από 1,0, υποδηλώνει μεγαλύτερο χρόνο μεταξύ της κατάποσης και της συλλογής δείγματος (> 2 ώρες). Αυτή η αναλογία έπεσε κάτω από 1,0 μέσα σε 3 ώρες για την αναλογία συγκέντρωσης BAC/EtG και 5 ώρες για συγκέντρωση BAC/EtS. Χρειάζεται η αναλογία συγκέντρωσης αιθανόλης/EtS περισσότερο από την αναλογία αιθανόλης/EtG για να πέσει κάτω από 1,0. Αυτό υποδηλώνει βραδύτερο ρυθμό αποβολής για το EtS σε σύγκριση με εκείνο του EtG (Alsayed et al., 2022).

Το υαλοειδές υγρό, χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανάλυση αιθανόλης, διότι πρόκειται για δείγμα καλά προστατευμένο από επιμολύνσεις. Στη βιβλιογραφία συναντώνται μόλις πέντε (5) δημοσιεύσεις σχετικά με την ανίχνευση του EtG (Keten et al., 2009; Rainio et al., 2013; Thierauf et al., 2011; Vezzoli et al., 2015; Wang et al., 2021) , και δύο (2), που περιλαμβάνουν και το EtS (Thierauf et al., 2011; Wang et al., 2021)

Στην πρώτη αναφορά της αναλυτικής διαδικασίας για τον εντοπισμό του EtG με δείγμα το υαλοειδές υγρό ελήφθησαν από 25 περιπτώσεις αυτοψίας (Keten et al., 2009). Πληροφορίες για το χρονικό διάστημα μεταξύ θανάτου και συλλογής δείγματος ήταν διαθέσιμες σε 23 περιπτώσεις και κυμαίνονταν από 12 έως 36 ώρες, με διάμεσο τις 17 ώρες. Τα BAC ήταν 33–358 mg/dL. Όλες οι περιπτώσεις ήταν θετικές για EtG και αιθανόλη αίματος, εκτός από μία περίπτωση, η οποία ήταν αρνητική. Η EtG ήταν μετρήσιμη στο αίμα σε 21 από τις 25 περιπτώσεις, στα ούρα σε 17 από τις 19 περιπτώσεις και σε υαλοειδές υγρό σε 19 από τις 25 περιπτώσεις. Τα αρνητικά αποτελέσματα στην τελευταία περίπτωση, θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τη φαρμακοκινητική του EtG, όπου το αλκοόλ αρχίζει να ανιχνεύεται στο

υαλοειδές υγρό 30 – 45 λεπτά μετά την κατάποση (Høiseth, Bernard, et al., 2007). Οι (Keten et al., 2009) δεν αναφέρουν συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων αιθανόλης υαλοειδούς υγρού (VHAC) και συγκεντρώσεων αιθανόλης στο αίμα, αλλά βρέθηκαν καλοί συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των συγκεντρώσεων του EtG σε αίμα και υαλοειδές υγρό, καθώς και σε υαλοειδές υγρό και ούρα.

Η μελέτη των (Keten et al., 2009) στόχευε στη διερεύνηση της ικανότητας του υαλοειδούς υγρού, για την ανίχνευση του EtG, και κατ' επέκταση, το διαχωρισμό της αιθανόλης που παράγεται μεταθανάτια, με εκείνη που έχει καταναλωθεί. Αναπτύχθηκε μια μέθοδος LC–MS/MS για την ποσοτικοποίηση της EtG στο αίμα, τα ούρα και το υαλοειδές υγρό, χρησιμοποιώντας ένα όργανο LC–ESI/MS ενός σταδίου. Παρόλο που η μέθοδος ήταν καλά σχεδιασμένη, ορισμένες σημαντικές παράμετροι επικύρωσης όπως η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα δεν πραγματοποιήθηκαν. Πολλές από τις θετικές περιπτώσεις είχαν στοιχεία της αναλυόμενης ουσίας ενδιαφέρον, εντός του εύρους των LOD και LOQ. Συνιστάται η χρήση των συγκεντρώσεων LOQ ως το χαμηλότερο σημείο στην καμπύλη βαθμονόμησης. Ωστόσο, σε αυτή τη διαδικασία, το πρώτο σημείο στην καμπύλη βαθμονόμησης ήταν δύο φορές υψηλότερο από το LOQ.

Οι (Thierauf et al., 2011) ανέφεραν τη χρήση του LC–MS/MS για την ανάλυση τόσο του EtG όσο και του EtS σε υαλοειδές υγρό. Το LOD ήταν 0,05 mg/L τόσο για το EtG όσο και για το EtS. Σε 26 περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύτηκε το EtG, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εύρος για EtG ήταν 0,1–9,4 mg/L με επίπεδο BAC 10–432 mg/dL, ενώ το εύρος EtS ήταν 0,23–4,1 mg/L. Η διάμεση τιμή BAC ήταν 200 mg/dL (εύρος 70–350 mg/dL) και η VHAC ήταν 250 mg/dL (εύρος 10–430 mg/dL), ενώ οι αναλογίες συγκέντρωσης VHAC/BAC και EtG/VH EtG στο αίμα ήταν 1,3 (εύρος 1,1–1,8) και 2,2 (εύρος 0,5–6,2), αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, για να γίνει διάκριση μεταξύ προθανάτιων και μεταθανάτιων πηγών αλκοόλ, είναι σημαντικό να υπολογιστούν οι αναλογίες μεταξύ των συγκεντρώσεων αλκοόλ στο αίμα, τα ούρα και το υαλοειδές υγρό, εκτός από την ανίχνευση των συγκεντρώσεων EtG και EtS.

Οι (Wang et al., 2021) ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ανάλυση των EtG και EtS στο αίμα και το υαλοειδές υγρό. Σε αυτή τη διαδικασία, συλλέχθηκαν δεδομένα MS/MS χρησιμοποιώντας MRM με τρόπο λειτουργίας αρνητικού ιόντος. Το LOD και το LOQ για τους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν ήταν 0,002 και 0,005 mg/L, αντίστοιχα. Σε 10 περιπτώσεις αυτοψίας, τόσο αίμα όσο και υαλοειδές υγρό ήταν διαθέσιμα για εξέταση. Σε αυτή τη μελέτη, οι συγκεντρώσεις EtG και EtS στο αίμα κυμαίνονταν από μη ανιχνευμένες έως 22,3 mg/L και

μη ανιχνεύσιμες έως 2,1 mg/L, αντίστοιχα. Αυτή η μέθοδος, σε συνδυασμό και με τις προαναφερθείσες έρευνες με πραγματικές περιπτώσεις έδειξαν ότι οι βιοδείκτες αιθανόλης (EtG και EtS) σε δείγματα αίματος ήταν αξιόπιστοι και χρήσιμοι κατά την ερμηνεία της πηγής αιθανόλης σε δείγματα μετά θάνατον.

Τα δείγματα μαλλιών είναι αυτά που προτιμούνται περισσότερο στις ιατροδικαστικές έρευνες, επειδή απέχουν από τις εσωτερικές μεταθανάτιες αλλαγές, ειδικά πτώματα που εμφανίζουν προχωρημένη σήψη. Ως εκ τούτου, το τεστ μαλλιών έχει γίνει ένα αξιόπιστο εργαλείο για την ανίχνευση ναρκωτικών. Ωστόσο, η ίδια η αιθανόλη δεν μπορεί να δοκιμαστεί απευθείας στα μαλλιά λόγω της πτητικής φύσης της και λόγω πιθανής επιμόλυνσης από εξωτερικές πηγές. Με την πρόοδο της τεχνολογίας του LC-MS και την ανακάλυψη του EtG ως βιοδείκτη της πρόσφατης χρήσης αλκοόλ, η χρήση των μαλλιών ως μήτρας δοκιμών έγινε δυνατή (Bendroth et al., 2008). Το όριο που εγκρίθηκε διεθνώς για να ληφθεί υπόψη η EtG σε δείγμα μαλλιών για επαναλαμβανόμενη κατανάλωση αλκοόλ ορίστηκε σε ≥ 7 pg/mg EtG στο εγγύς τμήμα τρίχας του τριχωτού της κεφαλής, μήκους 0–3 έως 0–6 cm, ενώ το κατώφλι για τη χρόνια χρήση ορίστηκε σε ≥ 30 pg/mg σε τρίχες μήκους 0-3 έως 0-6 cm (Kintz, 2015).

Για τη διερεύνηση της καταλληλότητας της χρήσης EtG σε δείγματα μαλλιών μετά θάνατον σε περιπτώσεις προηγούμενης κατάχρησης αλκοόλ, οι (Bendroth et al., 2008) μελέτησαν 70 περιπτώσεις στις οποίες 100 mg τρίχας υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με απιονισμένο νερό και επωάστηκαν όλη τη νύχτα στον υπερηχητή, μετά την οποία τελικά τα εκχυλίσματα εγχύθηκαν σε UPLC–ESI/MS. Το LOD για το EtG ήταν 0,9 pg/mg και το LOQ ήταν 2,5 pg/mg. Η μέθοδος παρήγαγε μια γραμμική απόκριση σε μια περιοχή από 5–15.000 pg/mg. Οι τιμές του αποτελέσματος της μήτρας στην απόκριση EtG ήταν σχεδόν 70%, και η επίδραση στην ποσοτικοποίηση αντισταθμίστηκε με τη χρήση του δευτερογενούς εσωτερικού προτύπου.

Σε μια μελέτη των (Bendroth et al., 2008), εξετάστηκαν 70 δείγματα μαλλιών αυτοψίας για ιατρονομικές έρευνες. Το μέσο βάρος του δείγματος ήταν 100 mg και η μέση ηλικία των αποθανόντων ήταν 47 έτη (εύρος 18–68 ετών). Το 17% των περιπτώσεων αφορούσε γυναίκες. Παρά την ανίχνευση EtG σε 65 περιπτώσεις, μόνο 49 περιπτώσεις θεωρήθηκαν θετικές, με τη συγκέντρωση EtG να κυμαίνεται από 8 έως 10.400 pg/mg. Μεταξύ των 49 θετικών περιπτώσεων, 39 αναγνωρίστηκαν ως ενδεικτικές χρόνιας χρήσης αλκοόλ με βάση τις συγκεντρώσεις EtG που είναι ≥ 30 pg/mg, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (Kintz, 2015), με την προειδοποίηση ότι μια συγκέντρωση EtG ≤ 30 pg/mg στα μαλλιά δεν αποκλείει την κατάχρηση αλκοόλ. Σε αυτήν την εφαρμογή, η δοκιμή EtG παρείχε αξιόπιστες πληροφορίες

σχετικά με το ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ από τους αποβιώσαντες, δεδομένου ότι ο σχηματισμός EtG συμβαίνει μόνο ενζυμικά όταν ένα άτομο είναι ζωντανό. Η χρήση εκχύλισης υγρού-υγρού έδωσε αποτελέσματα στις περισσότερες περιπτώσεις. Ωστόσο, η χρήση εκχύλισης ξηρής φάσης θα μπορούσε να αυξήσει τις ανακτήσεις και να παρέχει πολύ καθαρότερα εκχυλίσματα. Η εκχύλιση ξηρής φάσης με τεχνικές LC-ESI/MS χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της EtG σε δείγμα μαλλιών από αυτοψία που ολοκληρώθηκε 27 χρόνια μετά τον θάνατο (Politi et al., 2008). Αν και το αποτέλεσμα ήταν θετικό για EtG στα μαλλιά, δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί απόλυτη συγκέντρωση EtG λόγω προβλημάτων καταστολής ιόντων.

1.9.5 N-ακετυλοταυρίνη

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η πρόσληψη αιθανόλης στα ποντίκια οδηγεί σε αύξηση της απέκκρισης N-ακετυλοταυρίνης (NAT). Μετά τον μεταβολισμό της αιθανόλης, υπάρχει μεγάλη ποσότητα ακετυλο-CoA και οξικού οξέος στο σώμα. Αυτές οι ενώσεις παρέχουν την ακετυλομάδα που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του NAT από την ταυρίνη. Η βιοσύνθεση δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αλλά υπάρχουν δύο πιθανές οδοί. Η πρώτη οδός, πιθανώς η κύρια οδός, είναι μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του οξικού και της ταυρίνης, ενώ η δεύτερη οδός είναι μια αντίδραση μεταξύ ακετυλο-CoA και ταυρίνης (Hannuksela et al., 2007).

Η ταυρίνη είναι ένα συστατικό που υπάρχει ήδη στον οργανισμό, ενώ το 0,1% του συνολικού σωματικού βάρους αποτελείται από ταυρίνη. Αν και χημικά δεν είναι αμινοξύ λόγω της έλλειψης της καρβοξυλικής ομάδας, θεωρείται ως το πιο άφθονο αμινοξύ στο ανθρώπινο σώμα. Είναι ένα επαμφοτερίζον ιόν, σε κάθε φυσιολογική τιμή pH. Εξαιτίας αυτού, είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτό και δεν μπορεί να διασχίσει βιολογικές μεμβράνες. Η ταυρίνη έχει διαφορετικούς σημαντικούς βιοχημικούς ρόλους στο ανθρώπινο σώμα. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών, είτε επειδή μπορεί να εξαλείψει τοξικές ενώσεις είτε δρα ως ρυθμιστής ώσμωσης. Επίσης, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η ταυρίνη είναι αρκετά σημαντική. Θεωρείται ακόμη και ως απαραίτητο αμινοξύ στα νεογνά, ενώ καταγράφονται πολλές άλλες σημαντικές λειτουργίες της ταυρίνης στον οργανισμό του ανθρώπου (Lambert et al., 2015).

Το κύριο μειονέκτημα της N-ακετυλοταυρίνης ως βιοδείκτη για την πρόσληψη αλκοόλ είναι ότι αυτή η ένωση σχηματίζεται επίσης μετά από ασκήσεις αντοχής, όπως το τρέξιμο μεγάλων αποστάσεων ή ο μαραθώνιος. Προκειμένου να καθοριστεί εάν η N-ακετυλοταυρίνη

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αλκοόλης, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να συγκριθεί η ποσότητα που είναι ανιχνεύσιμη μετά από άσκηση αντοχής και η ποσότητα που μπορεί να ανιχνευθεί μετά την πρόσληψη αλκοόλ. Εάν το επίπεδό της μετά την κατανάλωση αλκοόλ είναι πολύ υψηλότερο από ό,τι μετά από μια άσκηση αντοχής, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αλκοόλης. Μια άλλη επιλογή είναι ο προσδιορισμός περισσότερων από ενός δεικτών αλκοόλ προκειμένου να ανιχνευθεί η κατανάλωση αλκοόλ (Miyazaki et al., 2015).

1.9.6 Αλκοόλες Ανώτερου Μοριακού Βάρους και άλλες Πτητικές Ενώσεις

Στο αίμα τόσο των ζωντανών ατόμων, όσο και των θανόντων, είναι πιθανό να βρεθούν πτητικές ενώσεις, εκτός της αιθανόλης. Στους ζώντες συναντώνται κυρίως ακετόνη, ισοπροπανόλη, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, βουτανόνη και αιθυλεστέρες, με κυριότερο τον οξικό αιθυλεστέρα. Μετά θάνατον ανιχνεύονται ακεταλδεΐδη, ακετόνη, ισοπροπανόλη, 1-προπανόλη, βουτανόνη, ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη, d-αμυλική αλκοόλη, οξική, προπιονική, βουτυρική, ισοβουτυρική και αιθυλεστέρες, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, και γλυκερόλη (V. A. Boumba et al., 2008). Η σπουδαιότητα της παρουσίας των παραπάνω πτητικών ενώσεων, και ακόμη περισσότερο, της επίτευξης του διαχωρισμού της προέλευσής τους, έγκειται στη χρησιμότητά τους ως βιοδείκτες για τη μεταθανάτια σήψη ή την επιμόλυνση του σώματος, από εξωτερικούς παράγοντες.

Σε πολλές περιπτώσεις, η παρουσία αυτών των πτητικών είναι αποτέλεσμα της μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής, αλλά άλλες είναι αποτέλεσμα της προθανάτιας κατανάλωσης αλκοόλ, ενώ η παρουσία ακετόνης μπορεί να είναι ενδογενής σε άτομα που είναι διαβητικά ή βρίσκονται σε περίοδο νηστείας (V. A. Boumba et al., 2008) Επιπλέον, η συγκέντρωση της ακετόνης μπορεί να αυξηθεί λόγω δηλητηρίασης από βαρβιτουρικά ή αλκοόλ, υποθερμία, μεταβολική κετοξέωση, καθώς και δηλητηρίαση από ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη οξειδώνεται γρήγορα σε ακετόνη, η οποία μπορεί να μετρηθεί για αρκετές ημέρες μετά (Canfield et al., 1998) Η ακετόνη είναι ένα από τα κετονοσώματα που μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανοί δείκτες της αλκοολικής κετοξέωσης, εκτός από το β-υδροξυβουτυρικό και το ακετοξικό οξύ (Brinkmann et al., 1998).

Η ισοπροπανόλη χρησιμοποιείται συνήθως ως αντισηπτικό και απολυμαντικό. Αν και είναι λιγότερο τοξικό από τη μεθανόλη και την αιθυλενογλυκόλη, προκαλεί μεγαλύτερη καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος από την αιθανόλη (Canfield et al., 1998).

Η 1-προπανόλη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες μεταθανάτια και μπορεί να συνεχίσει να αυξάνεται σε συγκέντρωση ακόμη και όταν η αιθανόλη έχει φτάσει στο αποκορύφωμά της. Έχει αναφερθεί ότι μια συγκέντρωση 1-προπανόλης μεγαλύτερη από 10% αιθανόλης στους μύς και μεγαλύτερη από 5% στο αίμα επιβεβαιώνει τη σήψη (V. A. Boumba et al., 2008). Ακόμη, από το εργαστήριο μας, έχει αναπτυχθεί το «κριτήριο της 1-προπανόλης». Σύμφωνα με αυτό, αν η συγκέντρωση της 1-προπανόλης στο μεταθανάτιο αίμα ξεπερνά τα 0,104 mg/dL, το δείγμα σημαίνεται θετικό στη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (V. Boumba et al., 2019). Συνεπώς, η 1-προπανόλη θεωρείται εξαιρετικός βιοδείκτης για το σχηματισμό αιθανόλης καθώς και δείκτης σήψης (Canfield et al., 1998)

Η μεθανόλη ή ξυλόπνευμα, χρησιμοποιείται συνήθως ως διαλύτης στη χημική βιομηχανία και είναι εξαιρετικά τοξική. Πρώτα μετατρέπεται σε φορμαλδεΐδη και στη συνέχεια σε μυρμηκικό οξύ, αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αλκοολική αφυδρογονάση και αλδεϋδική αφυδρογονάση, αντίστοιχα, και προκαλεί μεταβολική οξέωση που μπορεί να είναι θανατηφόρα (Canfield et al., 1998). Ακόμη, η μεθανόλη πρόκειται για το βασικό συστατικό των νοθευμένων ποτών. Ακόμη και αν υπάρχει και σε μη νοθευμένα αλκοολούχα ποτά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, υπάρχει περίπτωση να ανέρχεται σε ποσότητα 18 g/L. Αυτό, σημαίνει ότι σε αλκοολούχο ποτό με 40% αιθανόλη, βρίσκεται 0,72% (v/v) μεθανόλη. Όσον αφορά στο μεταβολισμό της από τον ανθρώπινο οργανισμό, η μεθανόλη τείνει να παραμένει στον οργανισμό αναλλοίωτη, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μέχρι να καταβολιστεί η αιθανόλη. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι η αναστολή του μεταβολισμού της μεθανόλης από την αιθανόλη θα συμβεί μετά από κατανάλωση σχετικά μικρής ποσότητας αιθανόλης, η οποία υπολογίζεται σε περίπου 36 g. Η ποσότητα αυτή ερμηνεύεται σε περίπου 100 ml αλκοολούχου ποτού που περιέχει 40% (v/v) αιθανόλη. Σε έναν ενήλικα, αυτό θα αποτρέψει το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού της μεθανόλης για τουλάχιστον 10 ώρες. Σημειώνεται, δε, ότι το αίσθημα του «hangover», οφείλεται κατ' αρχήν στη μεθανόλη. Στη θεραπευτική χρήση της αιθανόλης για τη θεραπεία της δηλητηρίασης από μεθανόλη, το επίπεδο αιθανόλης στο αίμα διατηρείται σε πολύ υψηλότερο επίπεδο και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, προκειμένου να διατηρηθεί η αναστολή του σχηματισμού της τοξικής ουσίας της μεθανόλης από την αλκοολική αφυδρογονάση (Paine, 2001).

Η αιθυλενογλυκόλη είναι το ενεργό συστατικό των αντιψυκτικών σκευασμάτων. Δεν είναι τόσο πτητική όσο η μεθανόλη και η ισοπροπανόλη και είναι πολύ τοξική ένωση. Η διόλη μετατρέπεται στο σώμα σε οξαλικό οξύ το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με το ασβέστιο στο σώμα και παράγει το αδιάλυτο οξαλικό ασβέστιο. Το οξαλικό ασβέστιο κατακρημνίζεται

στους νεφρούς και τον εγκέφαλο που οδηγεί στο θάνατο. Η δηλητηρίαση από αιθυλενογλυκόλη συχνά προσδιορίζεται χωρίς μεταθανάτια τοξικολογική ανάλυση, επειδή οι κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου μπορούν να φανούν μικροσκοπικά στο τμήμα του νεφρού ή του εγκεφάλου (Levine et al., 2013).

Τα αναφερόμενα υψηλότερα επίπεδα αλκοόλ σε περιπτώσεις μετά θάνατον είναι σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που αναφέρθηκαν μετά την κατανάλωση αλκοόλ για δείγματα που ελήφθησαν προθανάτια. Γενικά, η μικροβιακή δραστηριότητα στο ανθρώπινο πτώμα αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταβλητών και απρόβλεπτων μοτίβων αιθανόλης και ανώτερων αλκοολών. Η μεταθανάτια παραγωγή ανώτερων αλκοολών δε θα έμοιαζε παράλογο να ακολουθεί το μοτίβο παραγωγής αιθανόλης, αφού τα αντίστοιχα βιοχημικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν (V. A. Boumba et al., 2008). Επιπλέον, σε μεταθανάτιες περιπτώσεις με υψηλό BAC, είναι πιθανό κάποιο μέρος ή όλη η αιθανόλη που ανιχνεύθηκε να οφείλεται σε κατανάλωση αλκοόλ πριν από τη στιγμή του θανάτου, και το ίδιο θα μπορούσε να ισχύει για τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών. Προφανώς, χρειάζονται περισσότερα στοιχεία για την αφθονία και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις όλων των ανώτερων αλκοολών, και ιδιαίτερα των διακλαδισμένων, σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, προκειμένου να εκτιμηθεί σε ποιο βαθμό η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης ακολουθείται από υψηλότερη παραγωγή αλκοολών και ποιες συγκεντρώσεις υψηλότερες αλκοόλες θα μπορούσαν να προκύψουν από την κατάποση αλκοόλ ή από μεταθανάτια παραγωγή (V. A. Boumba, 2022).

Έχουν καταστρωθεί αρκετά μοντέλα, για την ανίχνευση των μικροοργανισμών που παράγουν τις ανώτερες αλκοόλες μεταθανάτια. Τα μοντέλα καταστρώνονται σε ελεγχόμενες, εργαστηριακές συνθήκες. Όπως δείχνουν και τα ίδια, η αιθανόλη ήταν η πιο άφθονη αλκοόλη που παρήχθη από όλα τα μικρόβια που δοκιμάστηκαν σε εργαστηριακές καλλιέργειες. Επιπλέον, σε όλες εκτός από μία από τις ελεγχόμενες βακτηριακές καλλιέργειες, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης προηγήθηκαν των συγκεντρώσεων της 1-βουτανόλης ή των διακλαδισμένων ανώτερων αλκοολών. Η μόνη εξαίρεση ήταν οι καλλιέργειες *E. faecalis*, όπου η 1-βουτανόλη προηγήθηκε των άλλων ανώτερων αλκοολών. Αυτή η παρατήρηση εξηγεί πιθανώς γιατί η 1-προπανόλη είναι η ανώτερη αλκοόλη που έχει μελετηθεί περισσότερο σε περιπτώσεις μετά θάνατον, δεδομένου ότι τα βακτήρια είναι οι πιο συνηθισμένοι άποικοι ενός νεκρού σώματος και ότι, συνήθως, εισβάλλουν πρώτα στα διαφορετικά διαμερίσματα του σώματος μετά τον θάνατο (V. A. Boumba, 2022).

Από την άλλη πλευρά, τα είδη του γένους *clostridia* (*C. perfringens* και *C. sporogenes*) παρήγαγαν περισσότερη 1-βουτανόλη παρά 1-προπανόλη. Αυτή η παρατήρηση πιθανώς υποδεικνύει ότι τα κλωστρίδια προτιμούν την οδό ζύμωσης βουτυρικού-βουτανόλης-οξικού οξέος, η οποία παράγει 1-βουτανόλη απευθείας από υδατάνθρακες, παράλληλα με τις οδούς παραγωγής αιθανόλης (V. A. Boumba et al., 2008). Η κυρίαρχη παραγωγή 1-βουτανόλης από κλωστρίδια (υποχρεωτικά αναερόβια), τα οποία αναπτύσσονται κατά την όψιμη σήψη, είναι σύμφωνη με τις μελέτες που έχουν συσχετίσει την παρουσία 1-βουτανόλης με τη σήψη (Gubala, 1990) ή περιπτώσεις με ανεπάρκεια οξυγόνου (Bonte, 1987).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι, σε όλες τις καλλιέργειες *C. albicans*, τα επίπεδα των μεθυλοβουτανολών (ακολουθούμενα από ισοβουτανόλη) υπερίσχυσαν έναντι των επιπέδων της 1-προπανόλης, ενώ τα επίπεδα της 1-βουτανόλης ήταν αμελητέα. Επομένως, είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι η *C. albicans*, υπό τις εφαρμοζόμενες εργαστηριακές συνθήκες, προτιμά τη σύνθεση διακλαδισμένων ανώτερων αλκοολών από το νεοσχηματισμό της 1-προπανόλης. Αυτή η πτυχή διαφοροποιεί τις καλλιέργειες μυκήτων (Velivasi, Kourkoumelis, et al., 2021) από τις βακτηριακές καλλιέργειες (V. A. Boumba et al., 2012, 2013; Velivasi, Sakkas, et al., 2021b) που μελετήθηκαν μέχρι τώρα, όπου η 1-προπανόλη ήταν η κυρίαρχη αλκοόλη, και από τις καλλιέργειες κλωστριδίων (V. A. Boumba et al., 2012), όπου η 1-βουτανόλη κυριαρχεί στις υψηλότερες αλκοόλες. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί, σε αυτό το σημείο, ότι τα αναφερόμενα επίπεδα μεθυλοβουτανόλης στις αντίστοιχες μελέτες ήταν το άθροισμα των συγκεντρώσεων αμυλο- και ισοαμυλο-αλκοολών που παρήχθησαν σε ίσες ποσότητες σε όλες τις καλλιέργειες (V. A. Boumba, 2022).

Όσον αφορά στους ζώντες, οι ανώτερες αλκοόλες, όπως η 1-προπανόλη, η ισοβουτανόλη, η 1-βουτανόλη και η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, είναι μεταξύ των πρωταρχικά στοχευμένων συγγενών παραγόντων κατά τη ροή εργασίας και την αξιολόγηση της ανάλυσης συγγενών αλκοολών (Alcohol Congeners Analysis, ACA). Ειδικότερα, η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη θεωρούνται οι πιο σημαντικές από όλες τις συγγενείς ουσίες σε αυτή τη μεθοδολογία, ενώ οι μεθυλοβουτανόλες είναι δευτερεύουσας σημασίας λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων στο αίμα μετά την κατανάλωση αλκοόλ (Rodda et al., 2013).

Εκτός από τα παραπροϊόντα της ζύμωσης, συγγενείς χημικές ουσίες υπάρχουν και στα ποτά ως αποτέλεσμα των συστατικών και των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή τους. Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν αλδεΐδες, εστέρες, ισταμίνες, πρόσθετα, χρωστικές ουσίες, τανίνες, φαινόλες και άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις (Peterson, 2013) και

συχνά είναι ειδικά για ποτά. Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση ομοειδών βιοδεικτών συστατικών που υπάρχουν αποκλειστικά σε ορισμένους τύπους αλκοολούχων ποτών έχει διερευνηθεί μόνο σε ορισμένα αποστάγματα βοτάνων για την ανίχνευση της ευγενόλης, της ανηθόλης και της μενθόνης. Η ανίχνευση αυτών των βιοδεικτών συστατικών μπορεί να υποδηλώνει την κατανάλωση λικέρ από βότανα, γλυκάνισου και μέντας, καθώς δεν υπάρχουν σε άλλα αλκοολούχα ποτά. Μέχρι στιγμής, δεν έχουν εντοπιστεί άλλοι συγγενείς βιοδείκτες συστατικών για άλλα αλκοολούχα ποτά, συμπεριλαμβανομένης της μύρας και του κρασιού. Ο εντοπισμός τέτοιων ουσιών μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμος στο μέλλον για να καθοριστεί εάν καταναλώθηκε μύρα, κρασί ή κάποιο άλλο ποτό (Rodda et al., 2013).

Μοναδικές ουσίες μπορούν ενδεχομένως να εντοπιστούν από κατασκευαστές που καθορίζουν συγκεκριμένες συγγενείς ουσίες ως μέρος της εφαρμογής της νομοθετικής τους ευθύνης (Yilmaztekin & Cabaroglu, 2011) ή για ερευνητικούς σκοπούς στην επιδίωξη επίτευξης ενός καλύτερου προϊόντος (Siqueira et al., 2011). Επιπρόσθετα, η δημιουργία ενός προφίλ για κάθε αλκοολούχο ποτό έχει διεξαχθεί για να βοηθήσει στον εντοπισμό των ηλικιακών δεικτών των ποτών και στους ελέγχους ταυτότητας, με ορισμένους να το επιτυγχάνουν αυτό με ανάλυση των κύριων συστατικών των ποτών (Jung et al., 2010; Rodda et al., 2013). Η γνώση που αποκτάται από τη βιομηχανία αλκοόλ θα βοηθήσει στην ανακάλυψη πιθανών στόχων ως βιοδείκτες συστατικών για ένα συγκεκριμένο αλκοολούχο ποτό.

Εν γένει, πραγματοποιούνται απόπειρες για την καθιέρωση μιας ή περισσότερων ουσιών ως μοναδικούς δείκτες. Ωστόσο, οι έρευνες που απαιτούνται, θα πρέπει να διεξαχθούν γύρω από τη βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών, καθώς και τη φαρμακοκινητική που ακολουθούν στον ανθρώπινο οργανισμό, υπό διάφορες προσομοιωμένες συνθήκες.

Οποιαδήποτε ουσία ή ουσίες στοχεύονται ως δυνητικός μοναδικός δείκτης, είναι υποχρεωτικό οι ερευνητικές μελέτες να αξιολογούν πόσο μοναδικός μπορεί να είναι αυτός ο δείκτης και φυσικά η βιοδιαθεσιμότητα και η φαρμακοκινητική στον άνθρωπο υπό διάφορες προσομοιωμένες συνθήκες (Peterson, 2013). Ακόμη, η στοχευμένη συγγενής ένωση, πρέπει επίσης να είναι ανιχνεύσιμη με τις συμβατικές τεχνικές. Οι αναλυτικές τεχνικές για την ανίχνευση των συγγενών βιοδεικτών μπορούν να περιλαμβάνουν περισσότερες τεχνικές από τις τρέχουσες πρακτικές με HS-GC-FID, μιας και οι ενώσεις διαθέτουν μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Υπήρξε πρόσφατη χρήση της Φασματομετρίας Μάζας για την ανίχνευση συγγενών ενώσεων μεγαλύτερου μοριακού βάρους εκτός από τα παραπροϊόντα ζύμωσης (όπως αρωματικές συγγενείς ουσίες) (Schulz et al., 2007) και με προκατεργασία μικροεκχύλισης

στερεάς φάσης για την ανίχνευση των συγγενών ουσιών που προέρχονται από βότανα (Schulz et al., 2008). Η LC-MS έχει χρησιμοποιηθεί μόνο για τα φλαβονοειδή στην μύρα (Intelmann et al., 2009). Τελικά η Φασματομετρία Μάζας είναι απαραίτητη για την απόκτηση της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας που απαιτούνται για ιατρικούς-νομικούς σκοπούς.

1.10 Σκοπός Μελέτης

Η αιθανόλη που ανιχνεύεται στον άνθρωπο, μπορεί να προέρχεται από τρεις πιθανές πηγές. Από την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, από μικροβιακή παραγωγή μεταθανάτια και από ενδογενή αλκοολογένεση. Σε περιστατικά δικαστικού ενδιαφέροντος, η ταυτοποίηση της προέλευσης της μετρούμενης αιθανόλης αποτελεί μείζον ζήτημα, διότι από αυτήν εξαρτάται ο καταλογισμός ευθυνών ή η αθώωση των εμπλεκόμενων. Στην περίπτωση που η εξέταση αφορά σε άτομο που δε βρίσκεται πλέον εν ζωή, μετράται η συγκέντρωση της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου, η οποία είναι πιθανό να διαφέρει από τη μετρούμενη συγκέντρωσή της στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά. Για την αποσαφήνιση των παραγόντων στους οποίους οφείλεται η μεταθανάτια διαφοροποίηση των επιπέδων της αιθανόλης, εκτελούνται συνεχώς έρευνες.

Σκοπός της εν λόγω μελέτης είναι :

α) η βιβλιογραφική ανασκόπηση των δεικτών κατανάλωσης αιθανόλης, σε νεκροτομικό βιολογικό υλικό.

β) η αναδρομική καταγραφή και αξιολόγηση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα βιολογικά υλικά (κυρίως αίμα) που λαμβάνονται από κλινικά περιστατικά και από νεκροψίες – νεκροτομές. Σε αυτήν περιλαμβάνονται :

- Η συλλογή των χρωματογραφικών δεδομένων του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

- Η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα των λοιπών πτητικών ενώσεων που ανιχνεύονται στα κλινικά δείγματα.

- Η συσχέτιση των επιπέδων της αιθανόλης με τα επίπεδα των λοιπών πτητικών ενώσεων που ανιχνεύονται στα νεκροτομικά δείγματα.

- Η διερεύνηση της επίδρασης του βαθμού σήψης του πτώματος στα επίπεδα συγκεντρώσεων της αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων στο νεκροτομικό αίμα.

- Η μελέτη χημικών ενώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες προθανάτιας κατανάλωσης αιθανόλης, και ανιχνεύονται στο νεκροτομικό υλικό.

2 Μέθοδοι και Υλικά

2.1 Μέθοδοι

Η αέρια χρωματογραφία (GC) πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο τύπου Shimadzu GC 17A (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA). Ο διαχωρισμός των πτητικών πραγματοποιήθηκε σε δύο τριχοειδείς στήλες. Η πρώτη στήλη είναι υψηλής πολικότητας, επικαλυμμένη με σιλικόνη, τύπου SUPELCOWAX™ 10, μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και διαμέτρου των σωματιδίων επικάλυψης 0,25 μm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA). Η δεύτερη, είναι επίσης υψηλής πολικότητας, επικαλυμμένη με σιλικόνη, τύπου VOCOL μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και διαμέτρου των σωματιδίων επικάλυψης 1,5 μm.

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID). Ο χρωματογράφος περιλαμβάνει σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη από την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος τύπου AOC-5000 (Headspace-GC injection system) (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA), που πραγματοποιεί αυτόματα την επώαση του δείγματος, τη δειγματοληψία κλάσματος της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και την έγχυση (injection) του κλάσματος στη στήλη. Η θερμοστάτηση του τμήματος έγχυσης του δείγματος (Injector) έγινε στους 105°C και της στήλης στους 60°C, για τη SUPELCOWAX, και στους 55 °C για τη VOCOL. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο με ροή 0,7 ml/min. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή η πίεση του αέρα, του υδρογόνου και του αζώτου ήταν 50 Kpa, 55 Kpa και 75 Kpa, αντίστοιχα.

Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών μέτρησης της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης, της 1-βουτανόλης, της ισοβουτανόλης, ισοαμυλικής αλκοόλης, της αμυλικής αλκοόλης, της μεθανόλης και της ακετόνης, χρησιμοποιήθηκε αμπούλα (MEDICHEM) που περιέχει πρότυπα διαλύματα των ενώσεων σε συγκεντρώσεις 150 mg/dL για την αιθανόλη, 1 mg/dL για την ακετόνη, 2 mg/dL για τη μεθανόλη και 0,2 mg/dL για τα λοιπά πτητικά. Για την ακεταλδεΐδη και τον οξικό αιθυλεστέρα, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 2 mg/dL. Για τα Stock διαλύματα, εκλέχθηκε ως διαλύτης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε ισότονο διάλυμα (NaCl 0.85%), ενώ για τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ (Double Distilled Water, DDW), που αποστάχθηκε

με την αυτόματη αποστακτική συσκευή τύπου Aquatron A400D (Bibby Sterilin, Staffordshire, UK).

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

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

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

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

2.2 Διαλύματα

Τα πρότυπα διαλύματα 150 mg/dL για την αιθανόλη, 1 mg/dL για την ακετόνη, 2 mg/dL για τη μεθανόλη και 0,2 mg/dL για τα λοιπά πτητικά. Για την ακεταλδεΐδη και τον οξικό αιθυλεστέρα, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 2 mg/dL. Για τα Stock διαλύματα, εκλέχθηκε ως διαλύτης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε ισότονο διάλυμα (NaCl 0.85%), ενώ για τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ (Double Distilled Water, DDW), που αποστάχθηκε με την αυτόματη αποστακτική συσκευή τύπου Aquatron A400D (Bibby Sterilin, Staffordshire, UK). Το διάλυμα ακετονιτριλίου (εσωτερικό

πρότυπο) παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 mg/dL. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι και έξι μήνες.

2.3 Νεκροτομικό Υλικό

Συλλέχθηκαν τα χρωματογραφήματα από των αναλύσεων των βιολογικών υλικών από πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια σηπτικών εξεργασιών (πρώιμη ή προχωρημένη σήψη) ή από πτώματα χωρίς εμφανή σηπτικά φαινόμενα, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα αναφέρονται στο συνολικό όγκο των περιστατικών που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο, από το 2002 έως το 2021.

Τα βιολογικά υλικά της μελέτης αποτέλεσαν τα παρακάτω δείγματα, θετικά για αιθανόλη:

- 523 δείγματα ολικού αίματος,
- 14 δείγματα ούρων,
- 6 δείγματα γαστρικού περιεχομένου,
- 4 δείγματα υαλοειδούς υγρού του οφθαλμού,
- 1 δείγμα ήπατος και
- 1 δείγμα πνεύμονα.

2.4 Υλικό από Κλινικά Περιστατικά

Συλλέχθηκαν τα χρωματογραφήματα από των αναλύσεων των βιολογικών υλικών από άτομα εν ζωή που προσήλθαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, και εξετάστηκαν. Στη συνέχεια, τα δείγματα προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπου και ελέγχθηκαν. Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα αναφέρονται στο συνολικό όγκο των περιστατικών που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο, από το 2002 έως το 2021.

Τα βιολογικά υλικά της μελέτης αποτέλεσαν τα παρακάτω δείγματα, θετικά για αιθανόλη:

- 83 δείγματα ολικού αίματος,
- 4 δείγματα ούρων,
- 2 δείγματα ορού αίματος.

2.5 Ανάλυση Πτητικών Ενώσεων με Αέρια Χρωματογραφία

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

2.6 Ποιοτική Ανίχνευση Πτητικών Ενώσεων

Κατά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, και ο ποιοτικός προσδιορισμός των παρακάτω πτητικών ουσιών: αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), ακεταλδεύδη (CH_3CHO), 1-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), ακετόνη (CH_3COCH_3), μεθανόλη (CH_3OH), 1-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_3$), οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), ισοαμυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) και ακετονιτρίλιο (CH_3CN).

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

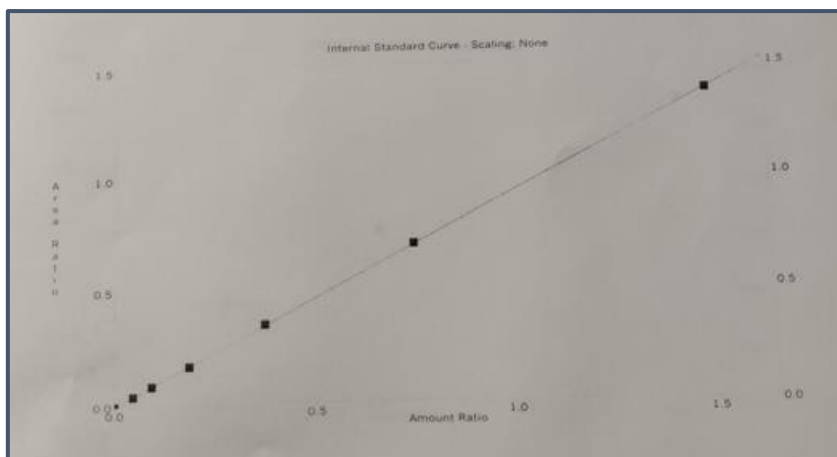
2.7 Ποσοτική Ανάλυση Αιθανόλης

Τα πρότυπα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της 2-προπανόλης, της μεθανόλης, της 1-βουτανόλης, της ισοβουτανόλης, της 3-μεθυλο-βουτανόλης, της 2-μέθυλο-βουτανόλης και της ακετόνης, παρασκευάστηκαν με τη χρήση αμπούλας, που περιείχε τις εν λόγω καθαρές ενώσεις, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Για την αιθανόλη, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις, ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 4,6875, 9,375, 18,75, 37,5, 75,0 και 150 mg/dL. Για τη μεθανόλη, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,00 και 2,00 mg/dL. Για την ακετόνη, 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 και 1,00 mg/dL. Για τα λοιπά αέρια της αμπούλας, 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 και 0,2 mg/dL.

Για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών της ακεταλδεΐδης και του οξικού αιθυλεστέρα χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια Ακεταλδεΐδη (MERCK) και Οξικός Αιθυλεστέρας (MERCK). Ως διαλύτης για τα πρότυπα διαλύματα ακεταλδεΐδης εκλέχθηκε το δις απεσταγμένο ύδωρ, ενώ για τα πρότυπα διαλύματα οξικού αιθυλεστέρα, εκλέχθηκε ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων ήταν 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,00 και 2,00 mg/dL.

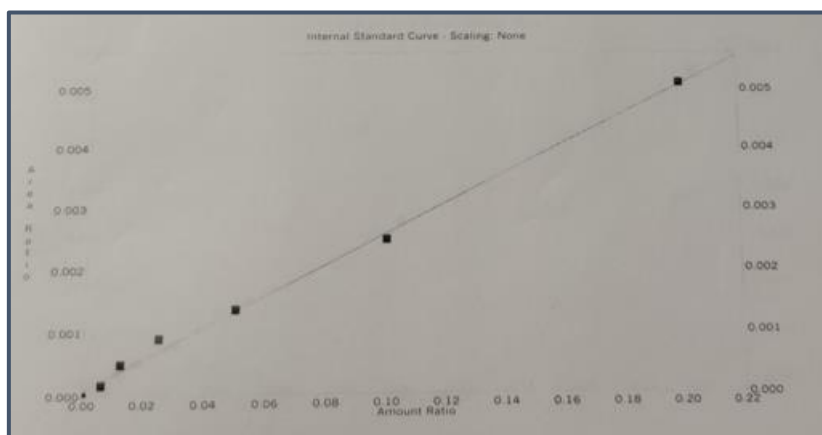
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης στο αίμα, στο υαλοειδές υγρό και στα ούρα πραγματοποιήθηκε με χρήση της πρότυπης καμπύλης της αιθανόλης που καταστρώθηκε, όπως και για τις λοιπές πτητικές ενώσεις.

Για την ποσοτικοποίηση δειγμάτων παλαιότερων ετών, χρησιμοποιήθηκαν τα χρωματογραφικά δεδομένα του εργαστηρίου, με τις αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες που εφαρμόζονταν στις εκάστοτε μεθόδους που ακολουθούνταν.

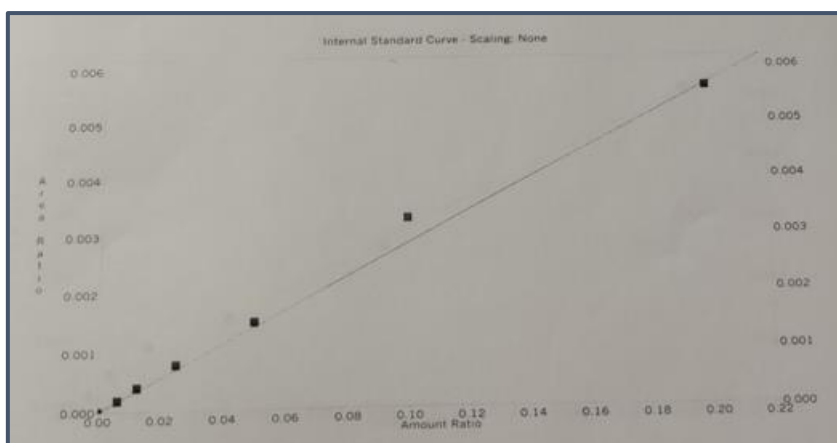


Σχήμα 13. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-150,0 mg/dL ($R^2 = 0,999974$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων.

2.8 Ποσοτική Ανάλυση 1-προπανόλης και 2-προπανόλης

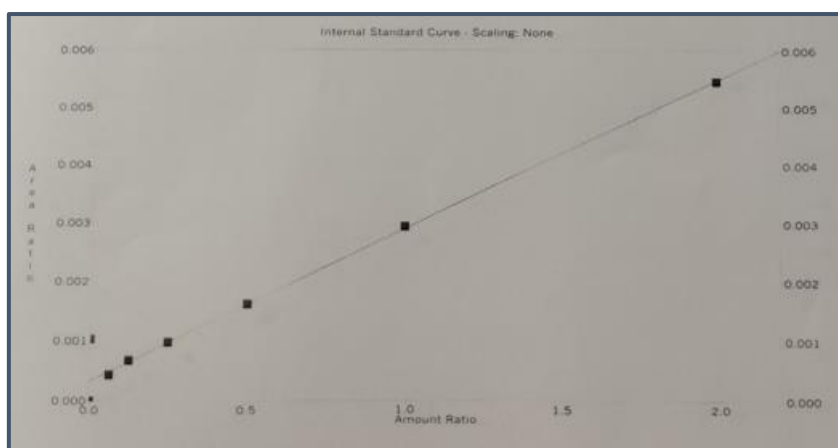


Σχήμα 14. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 1-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,998327$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

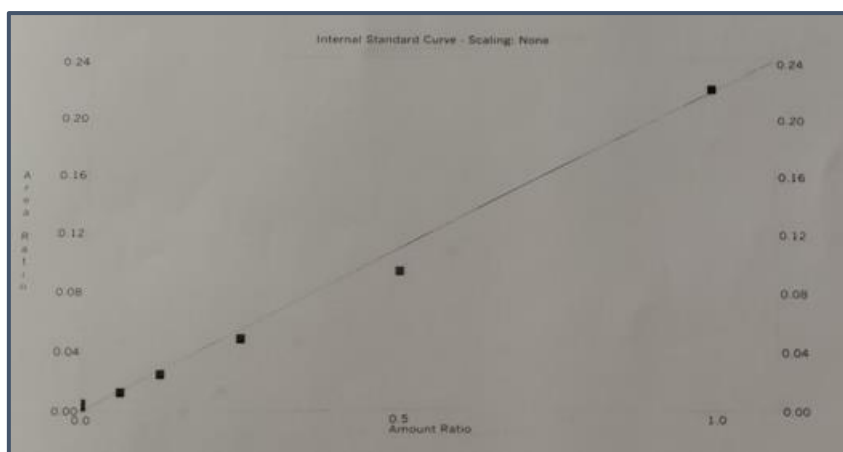


Σχήμα 15. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 2-προπανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999227$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

2.9 Ποσοτική Ανάλυση Μεθανόλης και Οξικού Αιθυλεστέρα

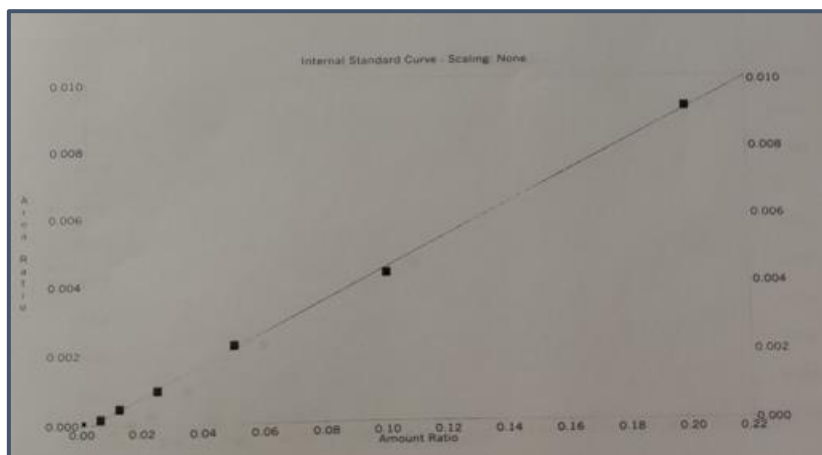


Σχήμα 16. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,999728$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

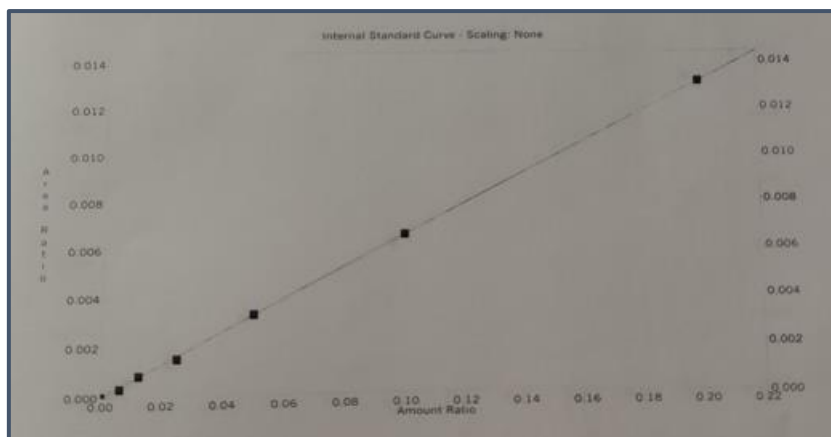


Σχήμα 17. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης του οξικού αιθυλεστέρα με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,997615$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

2.10 Ποσοτική Ανάλυση 1-βουτανόλης και Ισοβουτανόλης

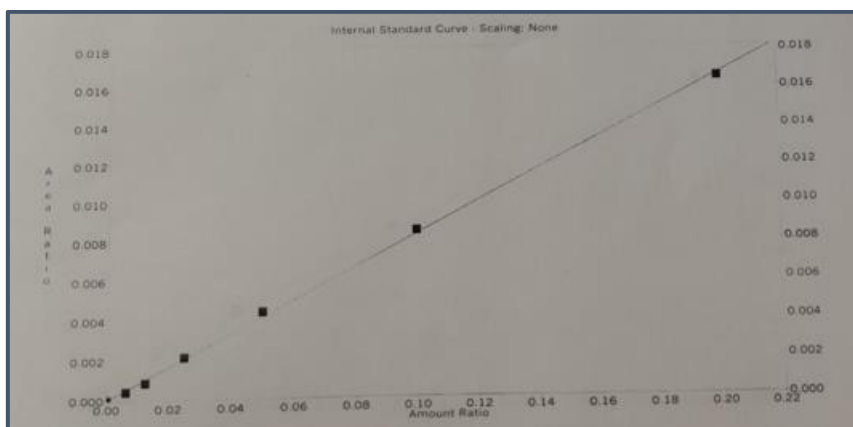


Σχήμα 18. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 1-βουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999243$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

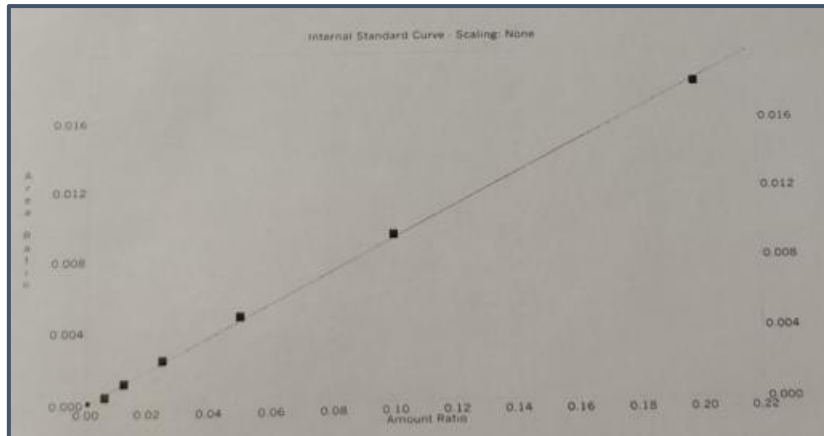


Σχήμα 19. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ισοβουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999777$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

2.11 Ποσοτική Ανάλυση 3-μεθυλο-βουτανόλης και 2-μεθυλο-βουτανόλης

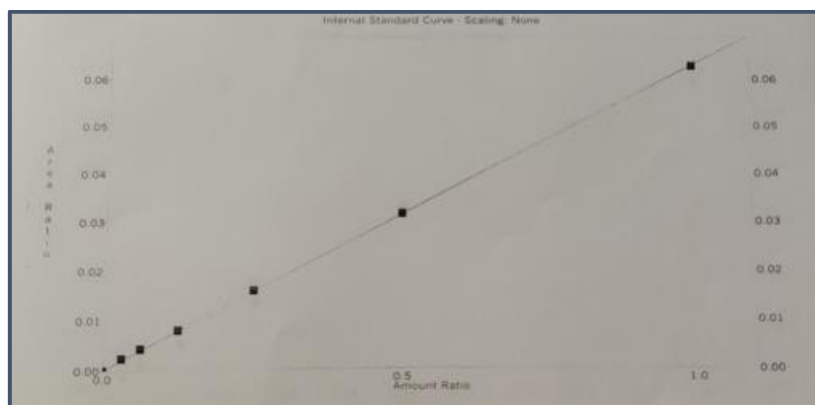


Σχήμα 20. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της 3-μεθυλο-βουτανόλης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-0,2 mg/dL ($R^2 = 0,999146$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

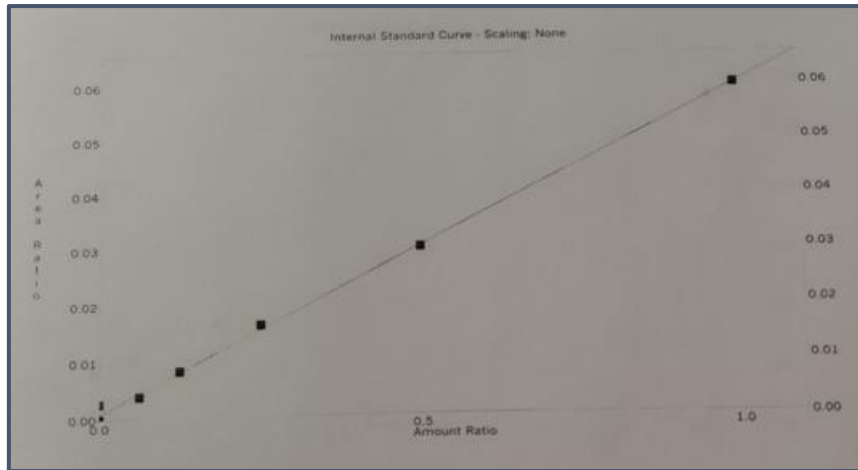


Σχήμα 21. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακετόνης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-20,0 mg/dL ($R^2 = 0,999312$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

2.12 Ποσοτική Ανάλυση Ακετόνης και Ακεταλδεΐδης



Σχήμα 22. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακετόνης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-1,0 mg/dL ($R^2 = 0,999878$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων



Σχήμα 23. Πρότυπη καμπύλη για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης με αέρια χρωματογραφία στην περιοχή 0,00-2,0 mg/dL ($R^2 = 0,999525$). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο μετρήσεων

2.13 Στατιστική Επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση των Πτητικών Ενώσεων με Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων στα βιολογικά υλικά, τόσο στα κλινικά όσο και τα νεκροτομικά, ήταν η Αέρια Χρωματογραφία Υπερκείμενης Φάσης (Headspace – GC), η οποία αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ανάλυση της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών που υπάρχουν σε βιολογικά υλικά (Tagliaro et al. 1992). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί τροποποίηση προηγούμενης μεθόδου (Machata 1975, Tagliaro et al. 1992).

Για το διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων των προηγούμενων ετών, επιλέχθηκε η στήλη SUPELCOWAX™10 που επέτρεπε την έκλυση και το διαχωρισμό πολικών ενώσεων με βάση την πολικότητα και τα μοριακά βάρη. Η θερμοστάτηση της στήλης έγινε στους 60°C. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ουσιών: αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, φορμαλδεΐδη, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη, βουτανόνη, οξικός αιθυλεστέρας, ισοαμυλική αλκοόλη, αμμωνία και ακετονιτρίλιο, σε 20 min.

Για τις πρόσφατες αναλύσεις έχει εκλεγεί η στήλη VOCOL, που επέτρεπε την έκλυση και το διαχωρισμό πολικών ενώσεων με βάση την πολικότητα και τα μοριακά βάρη. Η θερμοστάτηση της στήλης έγινε στους 55 °C, με αύξηση κατά 7 °C/min, έως και τους 85 °C. . Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ουσιών: αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ισοαμυλική αλκοόλη, αμυλική αλκοόλη και ακετονιτρίλιο, σε 18,5 min.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο. Η επιλογή του έγινε διότι δεν αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον οργανισμό του ανθρώπου, ενώ δεν αποτελεί και μεταθανάτιο προϊόν, κατά την αποσύνθεση (O' Neal et al. 1996b).

Η ανάλυση των δειγμάτων, έγινε στο πλαίσιο διεξαγωγής της ρουτίνας της Μονάδας Τοξικολογίας, του Τμήματος Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η πρώτη μέτρηση των δειγμάτων του βιολογικού υλικού έγινε 2-8 ώρες μετά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής.

3.2 Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων στα Βιολογικά Υλικά

3.2.1 Προσδιορισμός των επιπέδων αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων, σε κλινικά δείγματα

Κατά την περίοδο των ετών 2002-2021, αναλύθηκαν 445 δείγματα, από αντίστοιχο αριθμό ατόμων που βρίσκονταν εν ζωή και εξετάστηκαν κλινικά. Από αυτά, τα 91 βρέθηκαν θετικά σε αιθανόλη (20,5%) . Ο τύπος των δειγμάτων που αναλύθηκε, αφορούσε, κατά πλειοψηφία, σε αίμα (85 δείγματα), σε ούρα (4 δείγματα) και ορό αίματος (2 δείγματα). Στα δείγματα αίματος, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία, με το πρόγραμμα IBM SPSS.

Στα δείγματα αίματος, ανιχνεύονται οι εξής πτητικές ενώσεις: αιθανόλη (N = 85), 1-προπανόλη (N = 33), 2-προπανόλη (N = 21), μεθανόλη (N = 9), οξικός αιθυλεστέρας (N = 5), ακετόνη (N = 81), ακεταλδεΐδη (N = 79).

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στο αίμα, κυμαίνονται από 0,14 g/L έως 4,64 g/L. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης από 0,00 mg/L έως 2,25 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης από 0,04 mg/dL έως 0,77 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 1-προπανόλης από 0,00 mg/dL έως 0,23 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 2-προπανόλης από 0,01 mg/dL έως 1,14 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, εμφανίζονται στα 0,01 mg/dL, και στα 5 περιστατικά. Στον επόμενο πίνακα, γίνεται ποιοτική ανάλυση των πτητικών ενώσεων, σε δείγματα αίματος.

Πίνακας 7. Ποιοτική Ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε αίμα από ζώντες

Statistics							
	Αιθανόλη	1- προπανάλη	2- προπανάλη	Μεθανόλη	Οξικός Αιθυλεστέρας	Ακετόνη	Ακεταλδεΐδη
Valid N	85	33	21	9	5	81	79
Missing	0	52	64	76	80	4	6
Mean	1,5443	0,0807	0,1405	2,1021	0,0091	0,2202	,3200
Median	1,5451	0,0756	0,0500	0,7400	0,0100	0,1853	,1135
Std. Deviation	0,78121	0,04488	0,24612	4,14584	,00206	0,14377	,49325
Range	4,50	0,23	1,14	12,85	0,00	0,74	2,25
Minimum	0,14	0,00	0,01	0,17	0,01	0,04	0,00
Maximum	4,64	0,23	1,15	13,02	0,01	0,77	2,25

Στη συνέχεια, τα δείγματα αίματος, κατατάχθηκαν σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη συγκέντρωση αιθανόλης που προσδιορίστηκε σε αυτά. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης κάτω από 0,1 g/L, που θεωρείται πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης από 0,1 g/L έως 0,5 g/L. Δείγματα που βγαίνουν θετικά σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων, δε θεωρούνται ποινικά δικάσιμα. Στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης από 0,5 g/L έως 3,0 g/L. Δείγματα που βγαίνουν θετικά για αιθανόλη, και σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων, θεωρούνται ποινικά κολάσιμα, ενώ η ποσότητα της αιθανόλης δεν είναι τοξική. Τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L. Οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται τοξικές, και μπορούν να αποβούν μοιραίες. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκειμένη κατάταξη.

Πίνακας 8. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

		Αιθανόλη			
	Συγκέντρωση Αιθανόλης ($C_{αιθ}$), g/L	Αριθμός Δειγμάτων	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
A	$C_{αιθ} < 0,1$	0			
B	$0,1 < C_{αιθ} < 0,5$	8	9,4	9,4	9,4
Γ	$0,5 < C_{αιθ} < 3,0$	76	89,4	89,4	98,8
Δ	$C_{αιθ} > 3,0$	1	1,2	1,2	100,0
Total		85	100,0	100,0	

Μόνο ένα δείγμα (1/85, 1,2%) βρέθηκε με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L, 8/85 (9,4%) εμφανίζουν συγκεντρώσεις από 0,1 g/L έως 0,5 g/L, και 76/85 (89,4%) εμφανίζουν συγκεντρώσεις από 0,5 g/L έως 3,0 g/L.

Στη συνέχεια, τα δείγματα κατατάχθηκαν με βάση την προσδιοριζόμενη συγκέντρωση ακεταλδεΰδης, σε τέσσερις ομάδες. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΰδης κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΰδης από 0,1 mg/dL έως 0,5 mg/dL. Στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΰδης από 0,5 mg/dL έως 1,5 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακεταλδεΰδης μεγαλύτερη από 1,5 mg/dL. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 9. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης.

		Ακεταλδεΐδη				
		Συγκέντρωση Ακεταλδεΐδης (C _{ακεταλ}), mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent
Valid	A	C _{ακεταλ} < 0,1	31	36,5	39,2	39,2
	B	0,1 < C _{ακεταλ} < 0,5	34	40,0	43,0	82,3
	Γ	0,5 < C _{ακεταλ} < 1,5	8	9,4	10,1	92,4
	Δ	C _{ακεταλ} > 1,5	6	7,1	7,6	100,0
	Total		79	92,9	100,0	
Missing	System		6	7,1		
Total			85	100,0		

Από τα 85 δείγματα θετικά για αιθανόλη, τα 79 ήταν θετικά σε ακεταλδεΐδη. Βρέθηκαν 31/79 (36,5%) με συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μικρότερη από 0,1 mg/dL, 34/79 (40,0%) με συγκέντρωση από 0,1 mg/dL έως 0,5 mg/dL, 8/79 (9,4%) με συγκέντρωση από 0,5 mg/dL έως 1,5 mg/dL, και 6/79 (7,1%).

Ακόμη, ταξινομήθηκαν με τον ίδιο τρόπο και τα δείγματα που περιείχαν ακετόνη, σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την προσδιοριζόμενη συγκέντρωσή τους. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης από 0,1 mg/dL έως 0,5 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης μεγαλύτερη από 0,5 mg/dL. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 10. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακετόνης.

		Ακετόνη				
		Συγκέντρωση Ακετόνης ($C_{\text{ακετόνης}}$), mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
Valid	A	$C_{\text{ακετόνης}} < 0,1$	12	14,1	14,8	14,8
	B	$0,1 < C_{\text{ακετόνης}} < 0,5$	64	75,3	79,0	93,8
	Γ	$C_{\text{ακετόνης}} > 0,5$	5	5,9	6,2	100,0
	Total		81	95,3	100,0	
Missing	System		4	4,7		
Total			85	100,0		

Από τα 85 δείγματα θετικά για αιθανόλη, τα 81 ήταν θετικά σε ακετόνη. Βρέθηκαν 12/81 (14,1%) με συγκέντρωση ακετόνης μικρότερη από 0,1 mg/dL, 64/79 (75,3%) με συγκέντρωση από 0,1 mg/dL έως 0,5 mg/dL, και 5/79 (5,9%) με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,5 mg/dL.

Επιπλέον, ταξινομήθηκαν με τον ίδιο τρόπο και τα δείγματα που περιείχαν 1-προπανόλη, σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την προσδιοριζόμενη συγκέντρωσή τους. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης από 0,1 mg/dL έως 0,2 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης μεγαλύτερη από 0,2 mg/dL. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 11. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης

		1-προπανόλη				
		Συγκέντρωση 1-προπανόλης (C _{1-προπ}), mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
Valid	A	C _{1-προπ} < 0,1	25	29,4	75,8	75,8
	B	0,1 < C _{1-προπ} < 0,2	7	8,2	21,2	97,0
	Γ	C _{1-προπ} > 0,2	1	1,2	3,0	100,0
	Total		33	38,8	100,0	
Missing System			52	61,2		
Total			85	100,0		

Από τα 85 δείγματα θετικά για αιθανόλη, τα 33 ήταν θετικά σε 1-προπανόλη (38,8%). Βρέθηκαν 25/33 (75,8%) με συγκέντρωση 1-προπανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL, 7/33 (21,2%) με συγκέντρωση από 0,1 mg/dL έως 0,2 mg/dL, και μόλις 1/33 (5,9%) με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,2 mg/dL.

Τέλος, ταξινομήθηκαν με τον ίδιο τρόπο και τα δείγματα που περιείχαν 2-προπανόλη, σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την προσδιοριζόμενη συγκέντρωσή τους. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση ακετόνης κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης από 0,1 mg/dL έως 0,2 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση 1-προπανόλης μεγαλύτερη από 0,2 mg/dL. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 12. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-προπανόλης

		2-προπανόλη				
		Συγκέντρωση 2-προπανόλης (C _{2-προπ}), mg/dL	Αριθμός Δειγμάτων	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
Valid	A	C _{2-προπ} < 0,1	14	16,5	66,7	66,7
	B	0,1 < C _{2-προπ} < 0,5	6	7,1	28,6	95,2
	Γ	C _{2-προπ} > 0,5	1	1,2	4,8	100,0
	Total		21	24,7	100,0	
Missing System			64	75,3		
Total			85	100,0		

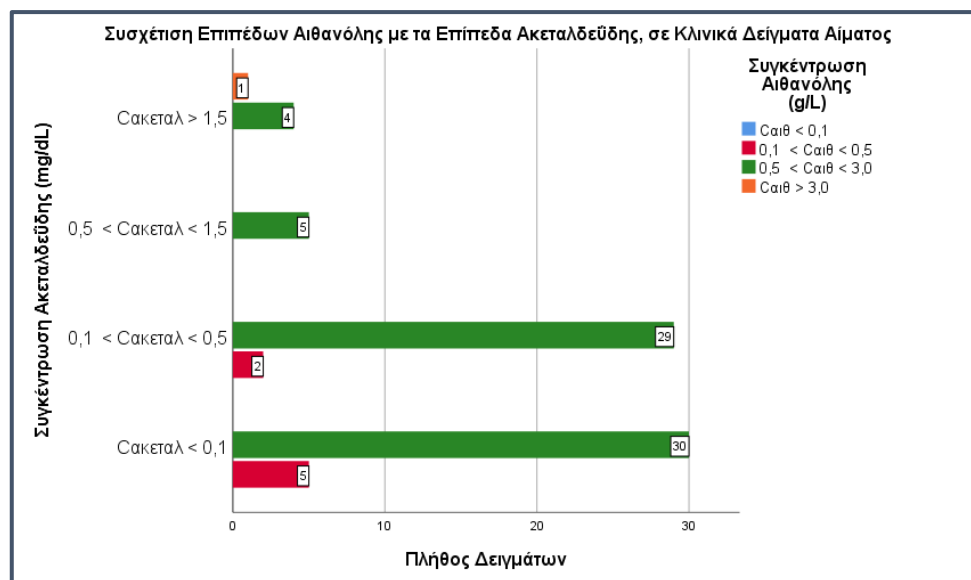
3.2.2 Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στα δείγματα αίματος από κλινικά περιστατικά, παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Δεν ανιχνεύεται ακεταλδεΐδη σε δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης C_{αιθ} < 0,1 g/L.

Από τα 7 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 5 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης C_{ακεταλ} < 0,1 mg/dL, και τα 2 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 68 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 30 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης C_{ακεταλ} < 0,1 mg/dL, τα 29 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 5 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 1,5 mg/dL, και τα 4 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης, μεγαλύτερη από 1,5 mg/dL.

Τέλος, βρέθηκε ένα δείγμα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, και η συγκέντρωση ακεταλδεϋδης ήταν $C_{\text{ακεταλ}} > 1,5 \text{ mg/dL}$



Σχήμα 24. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακεταλδεϋδης, σε κλινικά δείγματα αίματος

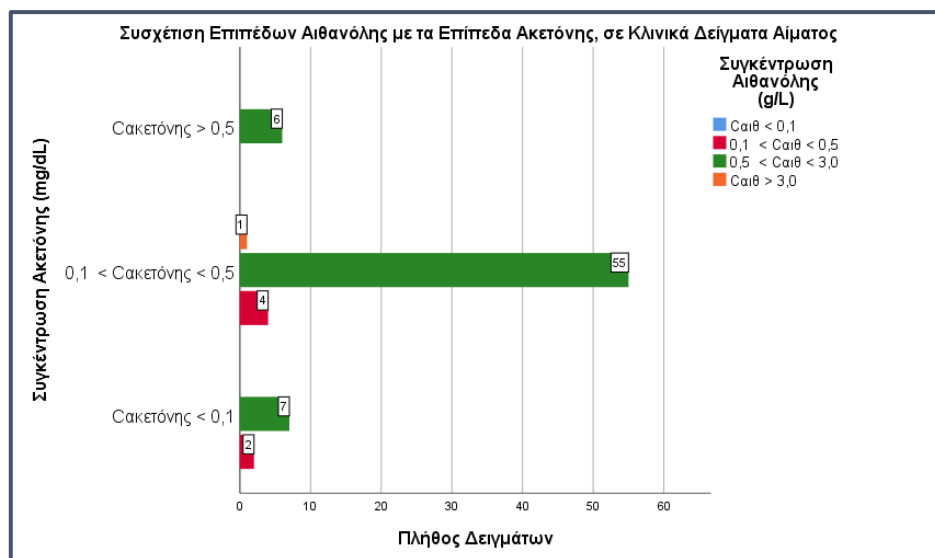
3.2.3 Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της ακετόνης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακετόνης στα δείγματα αίματος από κλινικά περιστατικά, παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Δεν ανιχνεύεται ακετόνη σε δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{\text{αιθ}} < 0,1 \text{ g/L}$.

Από τα 6 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 2 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετόνης}} < 0,1 \text{ mg/dL}$, και τα 2 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 68 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 7 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετόνης}} < 0,1 \text{ mg/dL}$, τα 55 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, και τα 6 είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετόνης}} > 0,5 \text{ mg/dL}$.

Τέλος, βρέθηκε ένα δείγμα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, και η συγκέντρωση ακετόνης ήταν μεταξύ 0,1 και 0,5 mg/dL.



Σχήμα 25. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακετόνης, σε κλινικά δείγματα αίματος

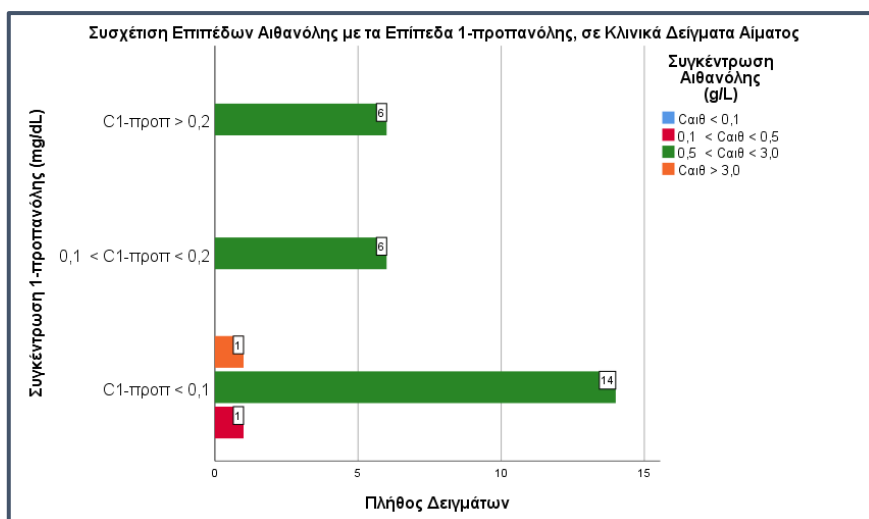
3.2.4 Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της 1-προπανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στα δείγματα αίματος από κλινικά περιστατικά, παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Δεν ανιχνεύεται 1-προπανόλη σε δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L.

Βρέθηκε ένα δείγμα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L και η συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1-προπ} < 0,1$ mg/dL.

Από τα 26 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 14 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1-προπ} < 0,1$ mg/dL, τα 6 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,2 mg/dL, και τα 6 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1-προπ} > 0,2$ mg/dL.

Τέλος, βρέθηκε ένα δείγμα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, και η συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1-προπ} < 0,1$ mg/dL.



Σχήμα 26. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 1-προπανόλης, σε κλινικά δείγματα αίματος

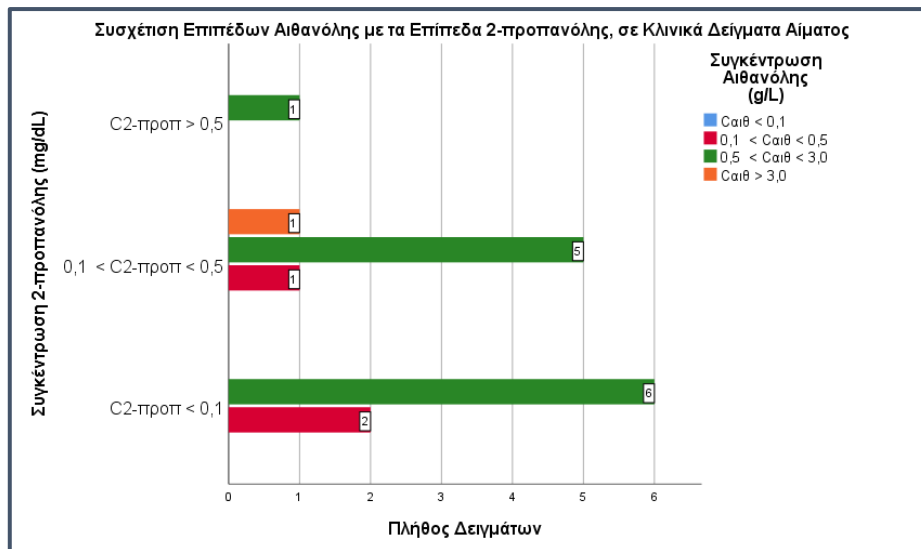
3.2.5 Συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη συγκέντρωση της 2-προπανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης στα δείγματα αίματος από κλινικά περιστατικά, παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Δεν ανιχνεύεται 1-προπανόλη σε δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L.

Από τα 3 αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, 2 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2-προπ} < 0,1$ mg/dL, και 1 είχε συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 12 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, 6 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2-προπ} < 0,1$ mg/dL, 5 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, και 1 είχε συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2-προπ} > 0,5$ mg/dL.

Τέλος, βρέθηκε ένα δείγμα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, και η συγκέντρωση 2-προπανόλης ήταν μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.



Σχήμα 27. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-προπανόλης, σε κλινικά δείγματα αίματος

3.2.6 Προσδιορισμός πτητικών ενώσεων σε άλλα βιολογικά υλικά

Βρέθηκαν δύο (2) δείγματα ορού αίματος θετικά σε αιθανόλη, χωρίς να ανιχνεύεται η παρουσία άλλης πτητικής ένωσης. Ακόμη, βρέθηκαν τέσσερα (4) δείγματα ούρων θετικά σε αιθανόλη. Από αυτά, μόλις το ένα εμφάνισε συγκέντρωση ακεταλδεΐδης 0,03 mg/dL, ακετόνης 0,11 mg/dL και 1-προπανόλης 0,1 mg/dL.

3.3 Προσδιορισμός των επιπέδων αιθανόλης και των λοιπών πτητικών ενώσεων, σε νεκροτομικά δείγματα

Κατά την περίοδο των ετών 2002-2021, αναλύθηκαν 1670 δείγματα, από αντίστοιχο αριθμό πτωμάτων, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Από αυτά, τα 549 βρέθηκαν θετικά σε αιθανόλη (32.9 %). Ο τύπος των δειγμάτων που αναλύθηκε, αφορούσε, κατά πλειοψηφία, σε αίμα (523 δείγματα), σε ούρα (14 δείγματα), γαστρικό περιεχόμενο (6 δείγματα), υαλοειδές υγρό (4 δείγματα), ιστοτεμάχιο πνεύμονα (1 δείγμα) και ιστοτεμάχιο ήπατος (1 δείγμα). Στα δείγματα αίματος, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία, με το πρόγραμμα IBM SPSS.

Στα δείγματα αίματος, ανιχνεύονται οι εξής πτητικές ενώσεις: αιθανόλη (N = 523), 1-προπανόλη (N = 443), 2-προπανόλη (N = 269), μεθανόλη (N = 67), οξικός αιθυλεστέρας (N =

62), 1-βουτανόλη (N = 62), ισοβουτανόλη (N = 59), 3-μεθυλο-βουτανόλη (N = 25), 2-μεθυλο-βουτανόλη (N = 13), ακετόνη (N = 470), ακεταλδεΐδη (N = 476).

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στο αίμα, κυμαίνονται από 0,06 g/L έως 6,73 g/L. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης από 0,01 mg/L έως 6,84 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης από 0,02 mg/dL έως 45,98 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 1-προπανόλης από 0,00 mg/dL έως 49,2 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 2-προπανόλης από 0,01 mg/dL έως 880,99 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα, εμφανίζονται στα 0,01 mg/dL έως 1,31 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης 0,17 mg/dL έως 58,47 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 1-βουτανόλης από 0,01 έως 23,14 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης από 0,01 mg/dL έως 0,24 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 3-μεθυλο-βουτανόλης από 0,00 mg/dL έως 0,31 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις 2-μεθυλο-βουτανόλης από 0,01 mg/dL έως 0,24 mg/dL. Στον επόμενο πίνακα (πίνακας 7), γίνεται ποιοτική ανάλυση των πτητικών ενώσεων, σε δείγματα αίματος.

Στη συνέχεια, τα δείγματα νεκροτομικού αίματος, κατατάχθηκαν σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη συγκέντρωση αιθανόλης που προσδιορίστηκε σε αυτά. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης κάτω από 0,1 g/L, που θεωρείται πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης από 0,1 g/L έως 0,5 g/L. Δείγματα που βγαίνουν θετικά σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων, δε θεωρούνται ποινικά «κολάσιμα». Στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης από 0,5 g/L έως 3,0 g/L. Δείγματα που βγαίνουν θετικά για αιθανόλη, και σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων, θεωρούνται ποινικά κολάσιμα, ενώ η ποσότητα της αιθανόλης δεν είναι τοξική. Τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L. Οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται τοξικές, και μπορούν να αποβούν μοιραίες. Στον παρακάτω πίνακα, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκειμένη κατάταξη.

Πίνακας 13. Ποιοτική Ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε νεκροτομικό αίμα

Statistics

	Αιθανόλη	1- προπανόλη	2- προπανόλη	Μεθανόλη	Οξικός Αιθυλεστέρας	Ισοβουτανόλη	1- βουτανόλη	3-μεθυλ- βουτανόλη	2-μεθυλ- βουτανόλη	Ακετόνη	Ακεταλδεΐδη
N											
Valid	523	443	269	67	62	59	62	25	13	470	476
Missing	0	80	254	456	461	464	461	498	510	53	47
Mean	1,2554	1,7613	4,3604	4,2180	0,1130	0,0497	1,0678	0,0498	0,0423	0,7228	0,5816
Median	0,8730	0,1173	0,1686	1,4600	0,0200	0,0360	0,2359	0,0181	0,0204	0,1700	0,1473
Std. Deviation	1,20258	4,09910	53,78487	9,66915	0,23827	0,04847	3,13103	0,08568	0,06524	2,77152	1,01821
Range	6,73	49,22	880,99	58,30	1,30	0,23	23,13	0,31	0,24	45,98	6,84
Minimum	0,06	0,00	0,01	0,17	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01
Maximum	6,79	49,22	881,00	58,47	1,31	,24	23,14	,31	,24	46,00	6,84

Πίνακας 14. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

		Αιθανόλη				
		Συγκέντρωση Αιθανόλης ($C_{αιθ}$), g/L	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	$C_{αιθ} < 0,1$	19	3,6	3,6	3,6
	B	$0,1 < C_{αιθ} < 0,5$	168	32,1	32,1	35,8
	Γ	$0,5 < C_{αιθ} < 3,0$	293	56,0	56,0	91,8
	Δ	$C_{αιθ} > 3,0$	43	8,2	8,2	100,0
	Total		523	100,0	100,0	

Βρέθηκαν 43/523 (8,2%) με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L, 168/523 (32,1%) εμφανίζουν συγκεντρώσεις από 0,1 g/L έως 0,5 g/L, 293/523 (56,0%) εμφανίζουν συγκεντρώσεις από 0,5 g/L έως 3,0 g/L, ενώ και 19/523 (3,6%) εμφανίζουν συγκέντρωση αιθανόλης κάτω από 0,1 g/L.

Στη συνέχεια, τα δείγματα νεκροτομικού αίματος, κατατάχθηκαν σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη συγκέντρωση 1-προπανόλης, 2-προπανόλης και μεθανόλης που προσδιορίστηκε σε αυτά. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση των πτητικών κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση από 0,1 mg/dL έως 3,0 mg/dL. Στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση από 3,0 mg/dL έως 9,0 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL. Στους παρακάτω πίνακες, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 15. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

1-προπανόλη						
		Συγκέντρωση 1-προπανόλης ($C_{1\text{προπ}}$), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	$C_{1\text{προπ}} < 0,1$	192	36,7	43,3	43,3
	B	$0,1 < C_{1\text{προπ}} < 3,0$	169	32,3	38,1	81,5
	Γ	$3,0 < C_{1\text{προπ}} < 9,0$	59	11,3	13,3	94,8
	Δ	$C_{1\text{προπ}} > 9,0$	23	4,4	5,2	100,0
	Total			443	84,7	100,0
Missing System			80	15,3		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 443 εντοπίζεται και 1-προπανόλη. Τα 192/443 (43,3%), έχουν συγκέντρωση 1-προπανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 169/443 (38,1%), έχουν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τα 59/443 (13,3%), έχουν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL. Τέλος, τα 23/443 (5,2%), έχουν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Πίνακας 16. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-προπανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

		2-προπανόλη				
		Συγκέντρωση 2-προπανόλης ($C_{2\text{προπ}}$), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	$C_{2\text{προπ}} < 0,1$	106	20,3	39,4	39,4
	B	$0,1 < C_{2\text{προπ}} < 3,0$	145	27,7	53,9	93,3
	Γ	$3,0 < C_{2\text{προπ}} < 9,0$	12	2,3	4,5	97,8
	Δ	$C_{2\text{προπ}} > 9,0$	6	1,1	2,2	100,0
	Total		269	51,4	100,0	
Missing System			254	48,6		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 269 εντοπίζεται και 2-προπανόλη. Τα 106/269 (39,4%), έχουν συγκέντρωση 2-προπανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 145/269 (53,9%), έχουν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τα 12/269 (4,5%), έχουν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL. Τέλος, τα 6/269 (2,2%), έχουν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Πίνακας 17. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις μεθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

		Μεθανόλη				
		Συγκέντρωση Μεθανόλης (C_{μεθ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	B	0,1 < C _{μεθ} < 3,0	52	9,9	77,6	77,6
	Γ	3,0 < C _{μεθ} < 9,0	10	1,9	14,9	92,5
	Δ	C _{μεθ} > 9,0	5	1,0	7,5	100,0
	Total			67	12,8	100,0
Missing System			456	87,2		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 456 εντοπίζεται και μεθανόλη. Τα 106/269 (39,4%), έχουν συγκέντρωση μεθανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 145/269 (53,9%), έχουν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τα 12/269 (4,5%), έχουν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL. Τέλος, τα 6/269 (2,2%), έχουν συγκέντρωση μεθανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Τέλος, τα δείγματα νεκροτομικού αίματος, κατατάχθηκαν σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα, 1-βουτανόλης, ισοβουτανόλης, 3-μεθυλο-βουτανόλης, 2-μεθυλο-βουτανόλης, ακετόνης και ακεταλδεϋδης που προσδιορίστηκε σε αυτά. Στην ομάδα Α, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση των πτητικών κάτω από 0,1 mg/dL. Στην ομάδα Β, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση από 0,1 mg/dL έως 0,5 mg/dL. Στην ομάδα Γ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση από 0,5 mg/dL έως 3,0 mg/dL. Τέλος, στην ομάδα Δ, κατατάσσονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL. Στους παρακάτω πίνακες, τα δείγματα εμφανίζονται ταξινομημένα, σύμφωνα με την προκείμενη κατάταξη.

Πίνακας 18. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, σε νεκροτομικό αίμα

Οξικός Αιθυλεστέρας

		Συγκέντρωση Οξικού Αιθυλεστέρα ($C_{\text{οξ.αιθυλ}}$), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	$C_{\text{οξ.αιθυλ}} < 0,1$	48	9,2	77,4	77,4
	B	$0,1 < C_{\text{οξ.αιθυλ}} < 0,5$	11	2,1	17,7	95,2
	Γ	$0,5 < C_{\text{οξ.αιθυλ}} < 3,0$	3	0,6	4,8	100,0
	Total		62	11,9	100,0	
Missing System			461	88,1		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 62 εντοπίζεται και οξικός αιθυλεστέρας. Τα 48/62 (77,4%), έχουν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 11/62 (17,7%), έχουν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Τα 3/62 (4,8%), έχουν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τέλος, κανένα δείγμα δεν έχει συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Πίνακας 19. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

		Ισοβουτανόλη				
		Συγκέντρωση Ισοβουτανόλης (C_{ισοβουτ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	C _{ισοβουτ} < 0,1	52	9,9	88,1	88,1
	B	0,1 < C _{ισοβουτ} < 0,5	7	1,3	11,9	100,0
	Total		59	11,3	100,0	
Missing System			464	88,7		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 59 εντοπίζεται και ισοβουτανόλη. Τα 52/59 (88,1%), έχουν συγκέντρωση ισοβουτανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 7/59 (11,9%), έχουν συγκέντρωση ισοβουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Κανένα δείγμα δεν εμφανίζει συγκέντρωση ισοβουτανόλης μεγαλύτερη από 0,5 mg/dL.

Πίνακας 20. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 1-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

1-βουτανόλη						
		Συγκέντρωση 1-βουτανόλης ($C_{1-βουτ}$), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	$C_{1-βουτ} < 0,1$	26	5,0	41,9	41,9
	B	$0,1 < C_{1-βουτ} < 0,5$	16	3,1	25,8	67,7
	Γ	$0,5 < C_{1-βουτ} < 3,0$	15	2,9	24,2	91,9
	Δ	$C_{1-βουτ} > 3,0$	5	1,0	8,1	100,0
	Total		62	11,9	100,0	
Missing System			461	88,1		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 62 εντοπίζεται και 1-βουτανόλη. Τα 26/62 (41,9%), έχουν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 16/62 (25,8%), έχουν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Τα 15/62 (24,2%), έχουν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τέλος, 5/62 δείγματα έχουν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Πίνακας 21. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 3-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

3-μεθυλο-βουτανόλη

		Συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης (C _{3-μ.βουτ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	C _{3-μ.βουτ} < 0,1	22	4,2	88,0	88,0
	B	0,1 < C _{3-μ.βουτ} < 0,5	3	0,6	12,0	100,0
	Total		25	4,8	100,0	
Missing System			498	95,2		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 25 εντοπίζεται και 3-μεθυλο-βουτανόλη. Τα 22/25 (88,0%), έχουν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 3/25 (12,0%), έχουν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Κανένα δείγμα δεν εμφανίζει συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης μεγαλύτερη από 0,5 mg/dL.

Πίνακας 22. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις 2-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

2-μεθυλο-βουτανόλη

		Συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης (C _{2-μ.βουτ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	C _{2-μ.βουτ} < 0,1	12	2,3	92,3	92,3
	B	0,1 < C _{2-μ.βουτ} < 0,5	1	,2	7,7	100,0
	Total		13	2,5	100,0	
Missing System			510	97,5		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 13 εντοπίζεται και 2-μεθυλο-βουτανόλη. Τα 12/13 (92,3%), έχουν συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Το 1/13 (7,7%), έχει συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Κανένα δείγμα δεν εμφανίζει συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης μεγαλύτερη από 0,5 mg/dL.

Πίνακας 23. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακετόνης, σε νεκροτομικό αίμα

		Ακετόνη				
		Συγκέντρωση ακετόνης (C _{ακετ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	C _{ακετ} < 0,1	116	22,2	24,7	24,7
	B	0,1 < C _{ακετ} < 0,5	258	49,3	54,9	79,6
	Γ	0,5 < C _{ακετ} < 3,0	79	15,1	16,8	96,4
	Δ	C _{ακετ} > 3,0	17	3,3	3,6	100,0
	Total		470	89,9	100,0	
Missing System			53	10,1		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 470 εντοπίζεται και ακετόνη. Τα 116/470 (24,7%), έχουν συγκέντρωση ακετόνης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 258/470 (54,9%), έχουν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Τα 79/470 (16,8%), έχουν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τέλος, 17/470 (3,6%) δείγματα έχουν συγκέντρωση ακετόνης μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Πίνακας 24. Κατάταξη των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, σε νεκροτομικό αίμα

Ακεταλδεΐδη						
		Συγκέντρωση ακεταλδεΐδης (C _{ακεταλ}), mg/dL	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A	C _{ακεταλ} < 0,1	167	31,9	35,1	35,1
	B	0,1 < C _{ακεταλ} < 0,5	176	33,7	37,0	72,1
	Γ	0,5 < C _{ακεταλ} < 3,0	115	22,0	24,2	96,2
	Δ	C _{ακεταλ} > 3,0	18	3,4	3,8	100,0
	Total		476	91,0	100,0	
Missing System			47	9,0		
Total			523	100,0		

Από τα 523 δείγματα που περιέχουν αιθανόλη, στα 476 εντοπίζεται και ακεταλδεΐδη. Τα 167/476 (35,1%), έχουν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μικρότερη από 0,1 mg/dL. Τα 176/476 (37,0%), έχουν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Τα 115/476 (24,2%), έχουν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL. Τέλος, 18/476 (3,8%) δείγματα έχουν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

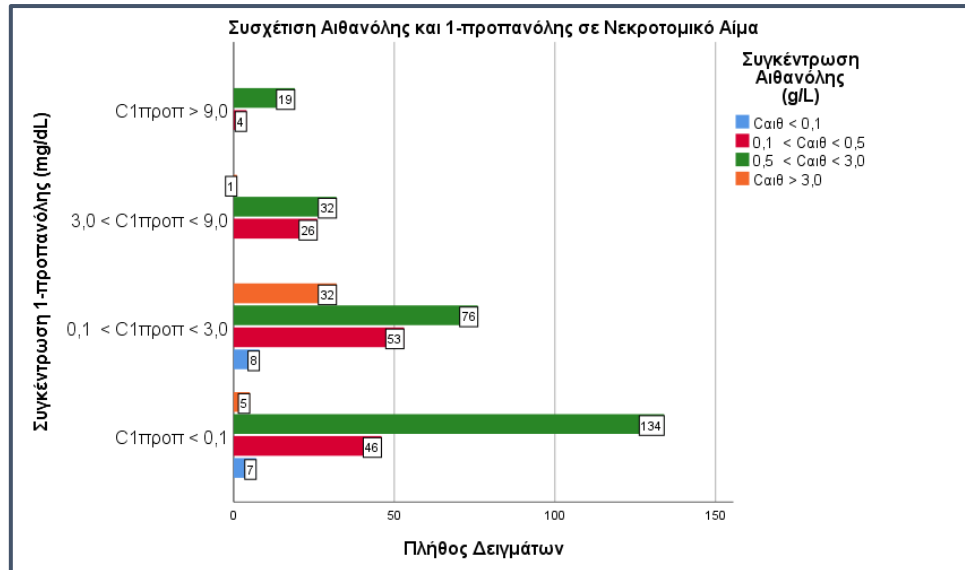
3.3.1 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 1-προπανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 15 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν C_{αιθ} < 0,1 g/L, τα 7 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης C_{1προπ} < 0,10 mg/dL και τα 8 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL.

Από τα 129 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 46 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL, τα 53 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, τα 26 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL, και τα 4 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης, μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Από τα 261 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 134 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL, τα 76 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, τα 32 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL, και τα 19 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης, μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Τέλος, από τα 38 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, τα 5 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης $C_{1\text{προπ}} < 0,10$ mg/dL, τα 32 είχαν συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL και ένα είχε συγκέντρωση 1-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL.



Σχήμα 28. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης και 1-προπανόλης σε νεκροτομικό αίμα

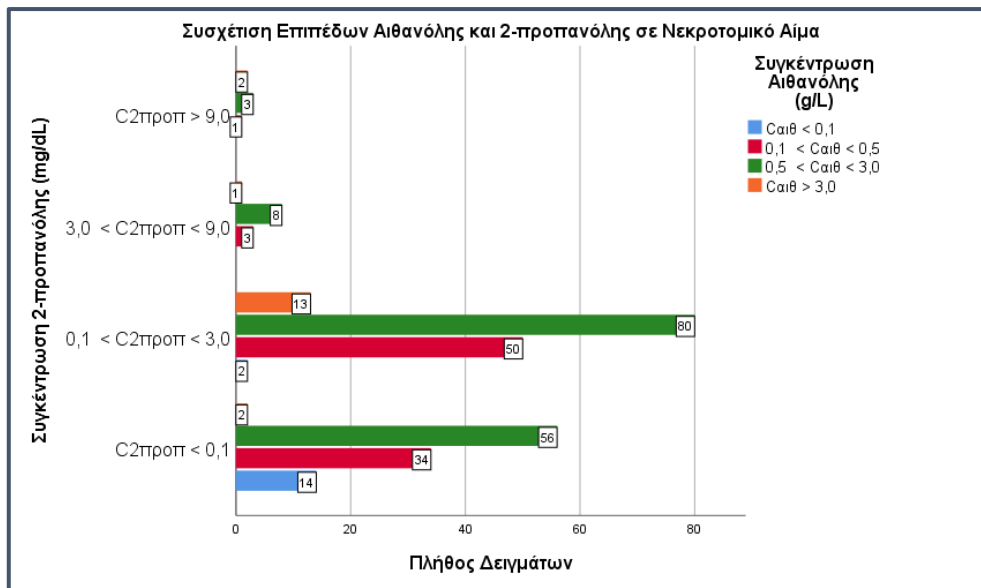
3.3.2 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 2-προπανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 16 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, τα 14 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2προπ} < 0,10$ mg/dL και το 1 είχε συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL.

Από τα 88 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 34 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2προπ} < 0,10$ mg/dL, τα 50 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, τα 3 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL, και το 1 είχε συγκέντρωση 2-προπανόλης, μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Από τα 147 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 56 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2προπ} < 0,10$ mg/dL, τα 80 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, τα 8 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL, και τα 3 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης, μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Τέλος, από τα 18 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, τα 2 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης $C_{2προπ} < 0,10$ mg/dL, τα 13 είχαν συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, ένα είχε συγκέντρωση 2-προπανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL, και δύο είχαν $C_{2προπ} > 9,0$ mg/dL.



Σχήμα 29. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-προπανόλης σε νεκροτομικό αίμα

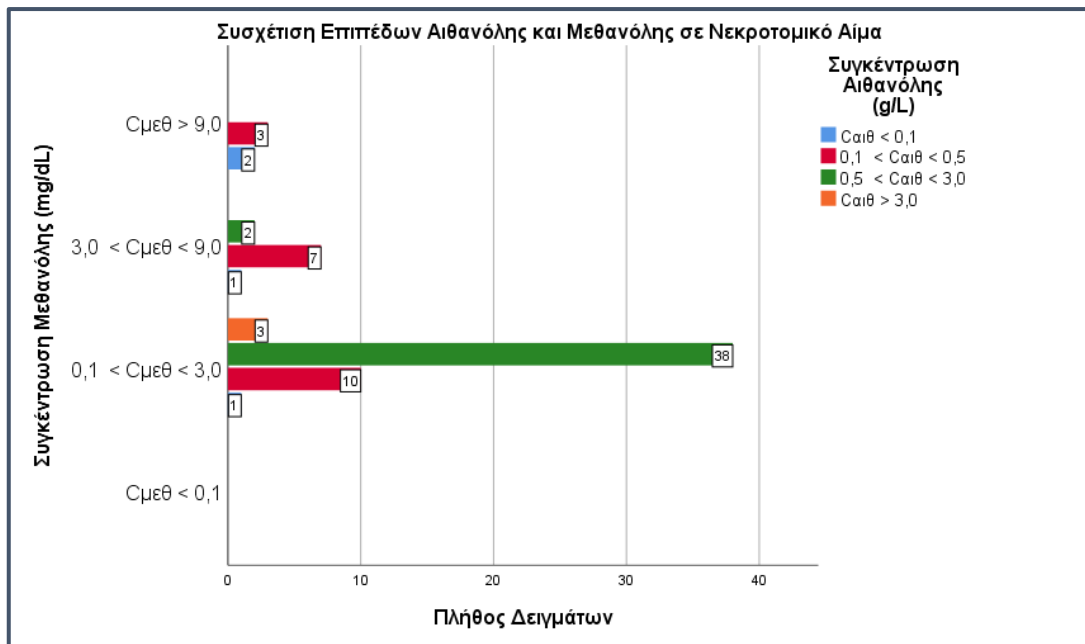
3.3.3 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Μεθανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της μεθανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 4 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, το ένα δείγμα είχε συγκέντρωση μεθανόλης $C_{μεθ} < 0,10$ mg/dL, ένα είχε συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 2 είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Από τα 20 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 10 δείγματα είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 0,10 mg/dL και 3,0 mg/dL, τα 7 είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL και τα 3 είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Από τα 40 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 38 δείγματα είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 0,10 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 2 συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 3,0 mg/dL και 9,0 mg/dL.

Τέλος, υπάρχουν 3 δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L, όπου και τα τρία είχαν συγκέντρωση μεθανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL.



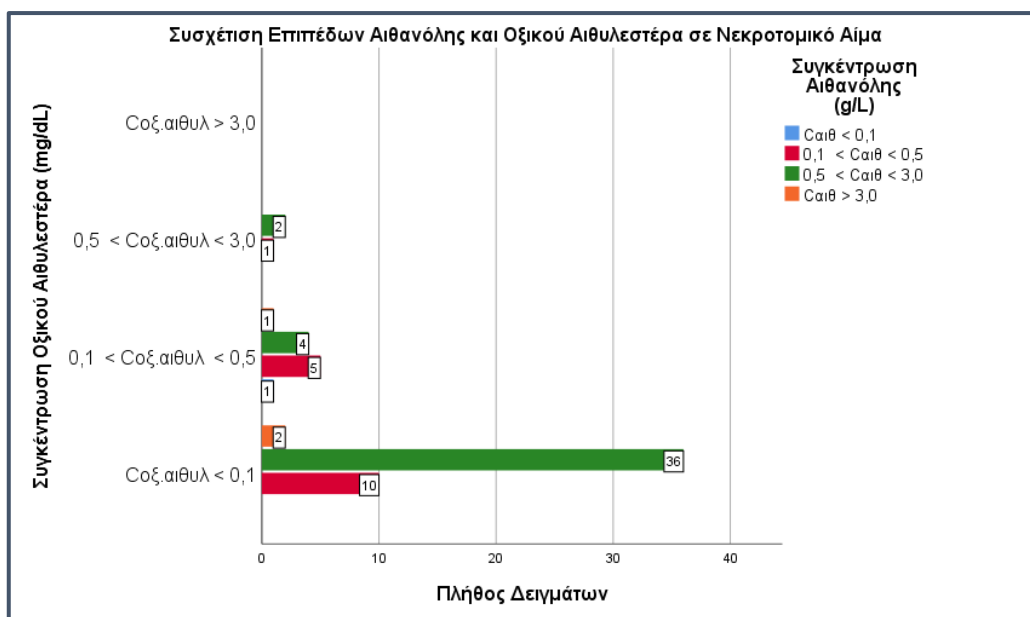
Σχήμα 30. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα μεθανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

3.3.4 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Οξικού Αιθυλεστέρα

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Ένα δείγμα είχε συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, και είχε συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 16 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 10 δείγματα είχαν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα $C_{οξ.αιθυλ} < 0,1$ mg/dL, τα 5 είχαν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,10 mg/dL και 0,5 mg/dL και το ένα είχε συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL.

Από τα 42 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 36 δείγματα είχαν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα $C_{οξ.αιθυλ} < 0,10$ mg/dL, τα 4 συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, και τα 2 είχαν συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL.



Σχήμα 31. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα

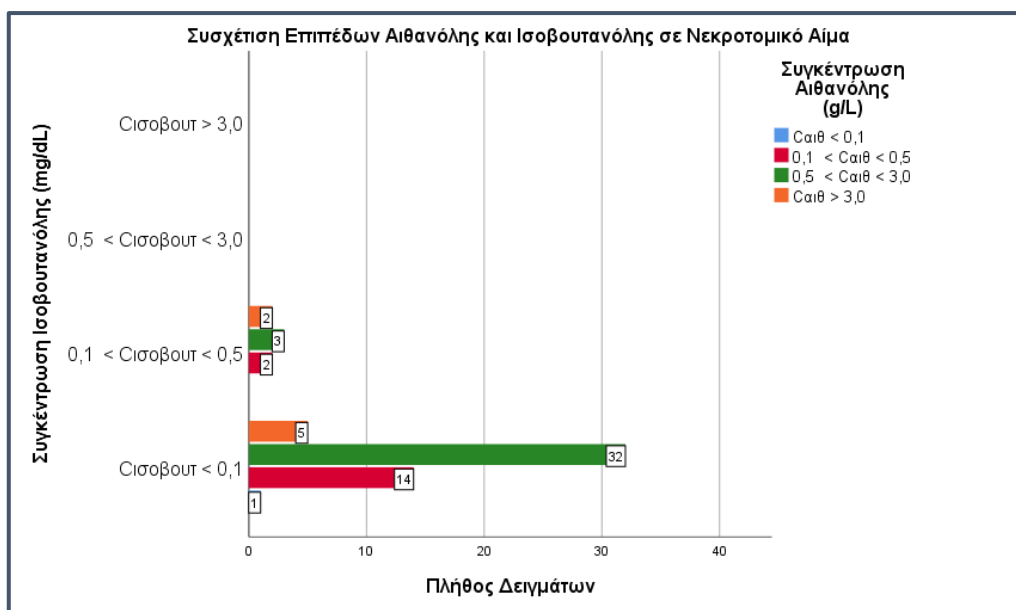
3.3.5 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ισοβουτανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Ένα δείγμα είχε συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, και είχε συγκέντρωση ισοβουτανόλης $C_{ισοβουτ} < 0,1$ mg/dL.

Από τα 16 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 14 δείγματα είχαν συγκέντρωση ισοβουτανόλης $C_{ισοβουτ} < 0,10$ mg/dL, και τα 2 είχαν συγκέντρωση ισοβουτανόλης μεταξύ 0,10 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 35 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 32 δείγματα είχαν συγκέντρωση ισοβουτανόλης $C_{ισοβουτ} < 0,10$ mg/dL, και τα 3 συγκέντρωση ισοβουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Τέλος, από τα 7 δείγματα που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} > 3,0$ g/L, τα 5 δείγματα είχαν συγκέντρωση ισοβουτανόλης $C_{ισοβουτ} < 0,10$ mg/dL, και τα 2 συγκέντρωση ισοβουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.



Σχήμα 32. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα οζικού αιθυλεστέρα, σε νεκροτομικό αίμα

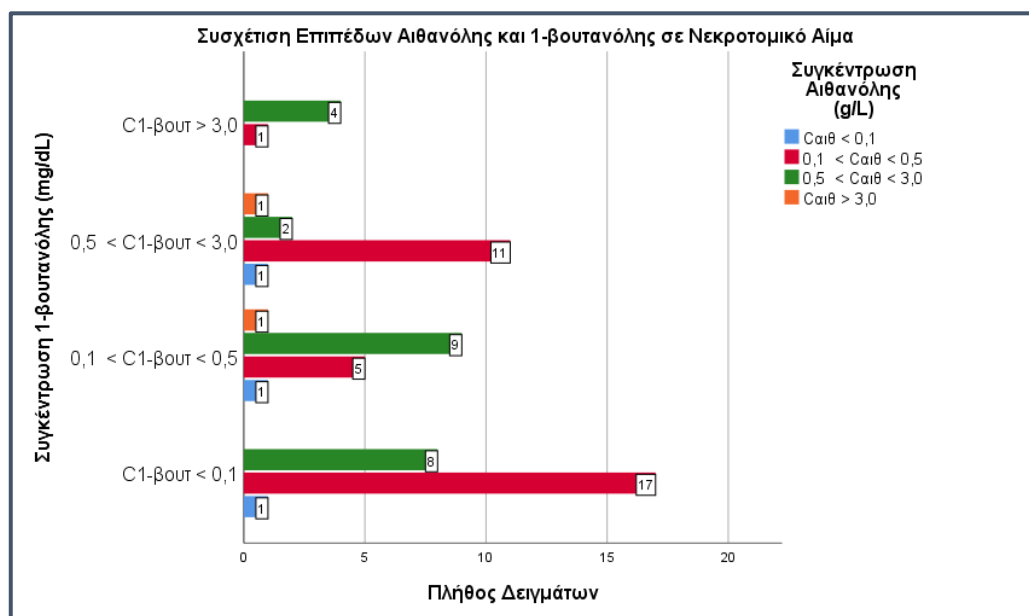
3.3.6 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 1-βουτανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 3 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, 1 δείγμα είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης $C_{1-βουτ} < 0,10$ mg/dL, 1 είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL και 1 είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 3,0 mg/dL.

Από τα 34 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 17 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης $C_{1-βουτ} < 0,1$ mg/dL, τα 5 είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 11 είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και το 1 είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης, μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Από τα 23 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 8 δείγματα είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης $C_{1-βουτ} < 0,1$ mg/dL, τα 9 είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 2 είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 4 είχαν συγκέντρωση 1-βουτανόλης, μεγαλύτερη από 9,0 mg/dL.

Τέλος, από τα 2 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, ένα δείγμα είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL και ένα είχε συγκέντρωση 1-βουτανόλης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL.



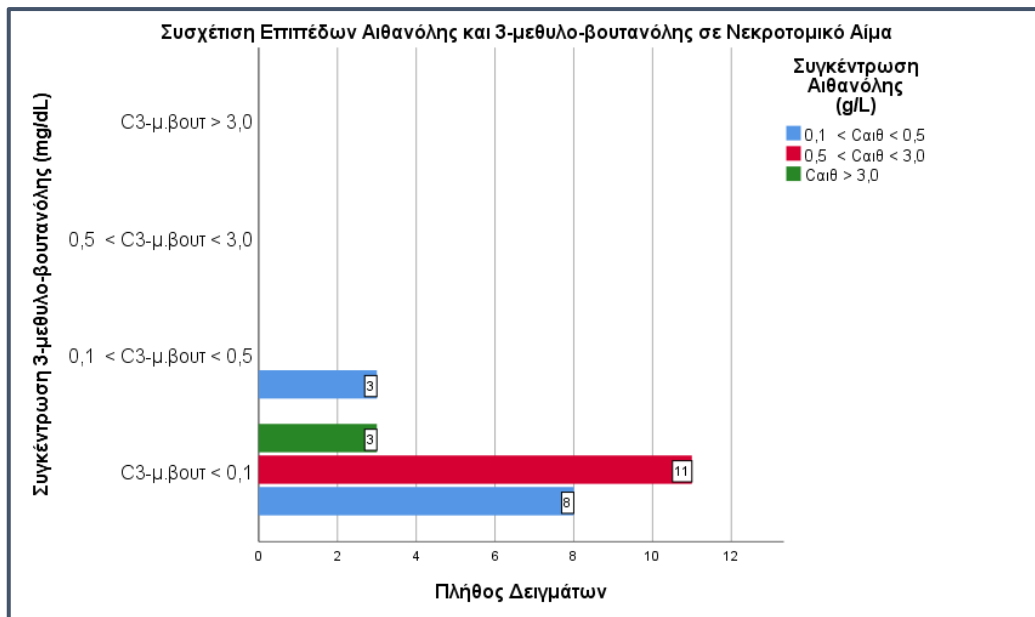
Σχήμα 33. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 1-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

3.3.7 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 3-μεθυλο-βουτανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 3-μεθυλο-βουτανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 11 δείγματα που είχαν συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, τα 8 είχαν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης $C_{3-μ,βουτ} < 0,1$ mg/dL, και 3 είχαν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 11 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, όλα τα δείγματα είχαν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης $C_{3-μ,βουτ} < 0,1$ mg/dL.

Τέλος, από τα 3 δείγματα που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, όλα τα δείγματα είχαν συγκέντρωση 3-μεθυλο-βουτανόλης $C_{3-μ,βουτ} < 0,1$ mg/dL.



Σχήμα 34. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 3-μεθυλο-βουτανόλης, σε νεκροτομικό αίμα

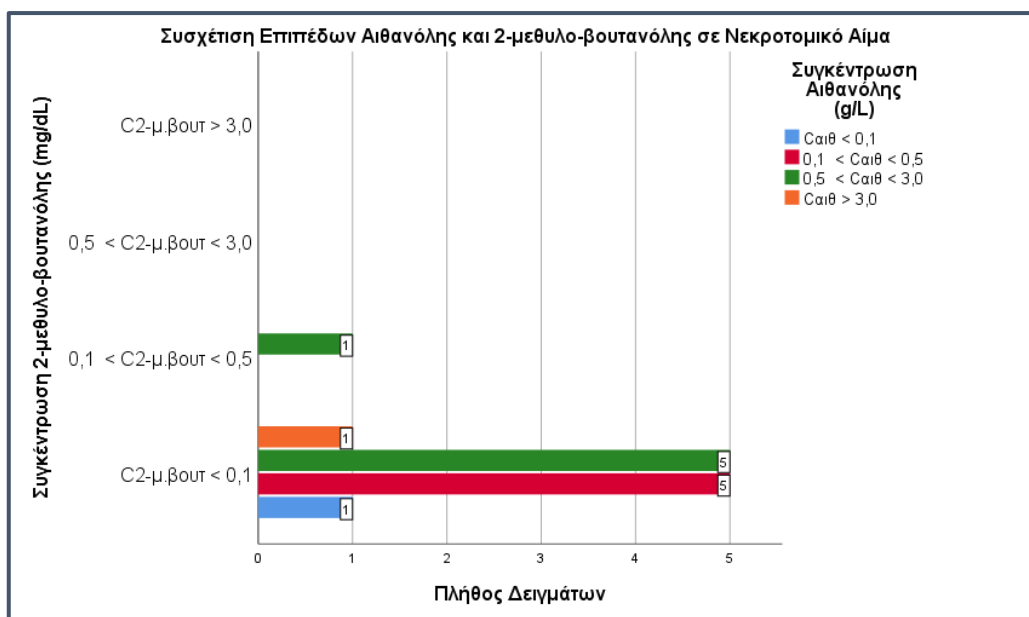
3.3.8 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα 2-μεθυλο-βουτανόλης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της 2-μεθυλο-βουτανόλης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Ένα δείγμα είχε συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} < 0,1$ g/L και συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης $C_{2-μ.βουτ} < 0,1$ mg/dL.

Βρέθηκαν 5 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L και όλα τα δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης $C_{2-μ.βουτ} < 0,1$ mg/dL.

Από τα 6 δείγματα που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 5 δείγματα είχαν συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης $C_{2-μ.βουτ} < 0,1$ mg/dL, και το ένα είχε συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Τέλος, βρέθηκε ένα δείγμα με συγκέντρωση αιθανόλης $C_{αιθ} > 3,0$ g/L, όπου η συγκέντρωση 2-μεθυλο-βουτανόλης ήταν $C_{2-μ.βουτ} < 0,1$ mg/dL.



Σχήμα 35. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα 2-μεθυλο-βουτανόλης

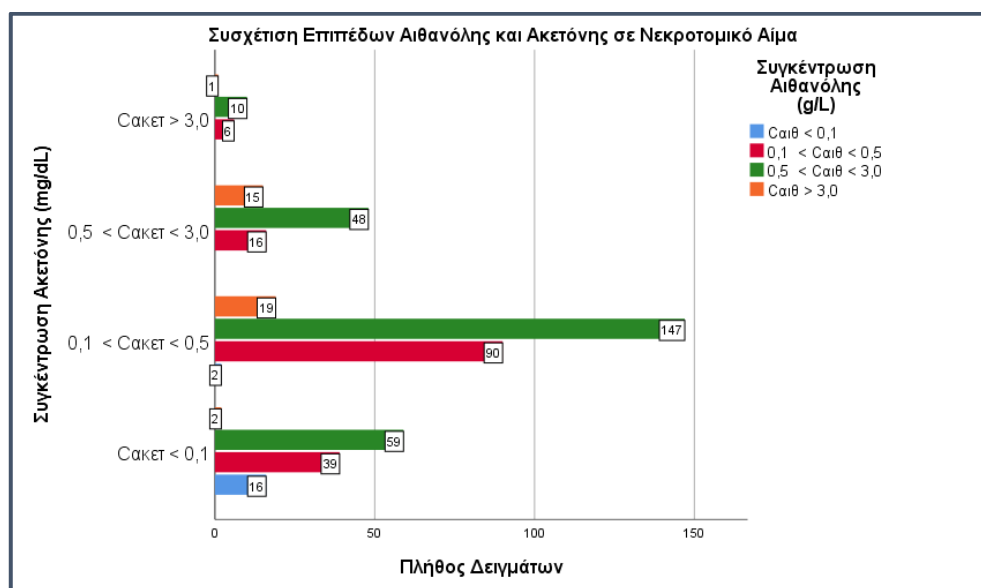
3.3.9 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ακετόνης

Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακετόνης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 18 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{αιθ} < 0,1$ g/L, 16 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{ακετ} < 0,10$ mg/dL και είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL.

Από τα 151 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 39 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{ακετ} < 0,1$ mg/dL, τα 90 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 16 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 6 είχαν συγκέντρωση ακετόνης, μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Από τα 264 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 59 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{ακετ} < 0,1$ mg/dL, τα 147 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 48 είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 10 είχαν συγκέντρωση ακετόνης, μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Τέλος, από τα 37 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, 2 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετ}} < 0,1$ mg/dL, 19 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, 15 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και ένα είχε συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακετ}} > 3,0$ mg/dL.



Σχήμα 36. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακετόνης, σε νεκροτομικό αίμα

3.3.10 Συσχέτιση των Επιπέδων Αιθανόλης με τα Επίπεδα Ακεταλδεΐδης

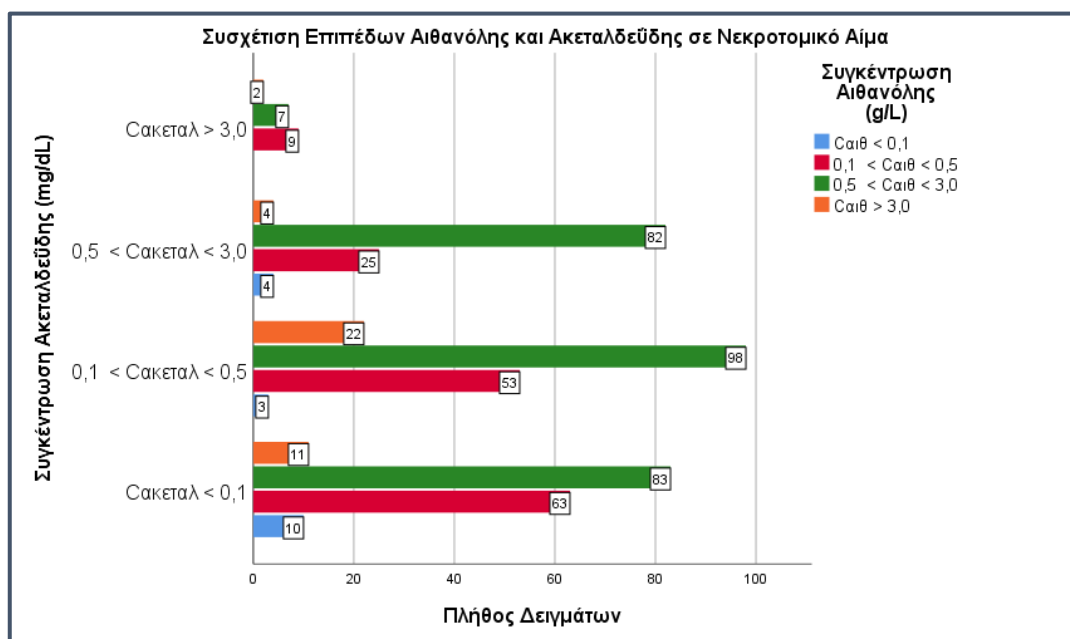
Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της αιθανόλης με τις συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στα δείγματα του νεκροτομικού αίματος παρουσιάζεται παρακάτω σχήμα. Από τα 17 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν $C_{\text{αιθ}} < 0,1$ g/L, 10 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακετόνης $C_{\text{ακεταλ}} < 0,1$ mg/dL, 3 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL και 4 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL.

Από τα 150 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L, τα 63 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{\text{ακεταλ}} < 0,1$ mg/dL, τα 53 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 25 είχαν συγκέντρωση

ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 9 είχαν συγκέντρωση ακετόνης, μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Από τα 270 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L, τα 83 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{\text{ακεταλ}} < 0,1$ mg/dL, τα 98 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, τα 82 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και τα 7 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης, μεγαλύτερη από 3,0 mg/dL.

Τέλος, από τα 39 δείγματα αίματος που η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη από 3,0 g/L, 11 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{\text{ακεταλ}} < 0,1$ mg/dL, 22 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL, 4 δείγματα είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης μεταξύ 0,5 mg/dL και 3,0 mg/dL, και 2 είχαν συγκέντρωση ακεταλδεΐδης $C_{\text{ακεταλ}} > 3,0$ mg/dL.



Σχήμα 37. Συσχέτιση των επιπέδων αιθανόλης με τα επίπεδα ακεταλδεΐδης σε νεκροτομικό αίμα

3.3.11 Μελέτη Επίδρασης του Τρόπου Θανάτου στη Συγκέντρωση των

Πτητικών Ενώσεων στο Αίμα

Από τα συνολικά 523 περιστατικά, που ήταν θετικά σε ανάλυση για αιθανόλη, τα 282 αντιστοιχούν σε βίαιους θανάτους, τα 137 σε αιφνίδιους και τα 137 σε αδιευκρίνιστους. Οι αδιευκρίνιστοι θάνατοι, χαρακτηρίζονται κατ' αυτόν τον τρόπο, λόγω των προηγμένων σηπτικών εξεργασιών που λαμβάνουν χώρα.

Όσον αφορά στους αιφνίδιους θανάτους, η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι τα 0,06 g/L, και η μέγιστη τα 6,24 g/L (STD : 1,30). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης είναι 0,00 mg/dL και η μέγιστη 49,22 mg/dL (STD : 5,22). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 3,11 mg/dL (STD : 0,76). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0,75 mg/dL και η μέγιστη 44,43 mg/dL (STD : 11,70). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,38 mg/dL (STD : 0,12). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,08 mg/dL (STD : 0,02). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 1,26 mg/dL (STD : 0,36). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,11 mg/dL (STD : 0,11). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,02 mg/dL (STD : 0,01). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακετόνης είναι 0,03 mg/dL και η μέγιστη 9,68 mg/dL (STD : 1,47). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 6,48 mg/dL (STD : 1,00).

Όσον αφορά στους αδιευκρίνιστους θανάτους, η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι τα 0,08 g/L, και η μέγιστη τα 4,23 g/L (STD : 0,85). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 30,70 mg/dL (STD : 5,04). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 40,47 mg/dL (STD : 6,27). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0,26 mg/dL και η μέγιστη 58,47 mg/dL (STD : 15,88). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,55 mg/dL (STD : 0,17). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 0,21 mg/dL (STD : 0,05). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 23,14 mg/dL (STD : 4,19). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,00 mg/dL και η μέγιστη 0,31 mg/dL (STD : 0,11). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,24 mg/dL (STD : 0,08). Η ελάχιστη τιμή

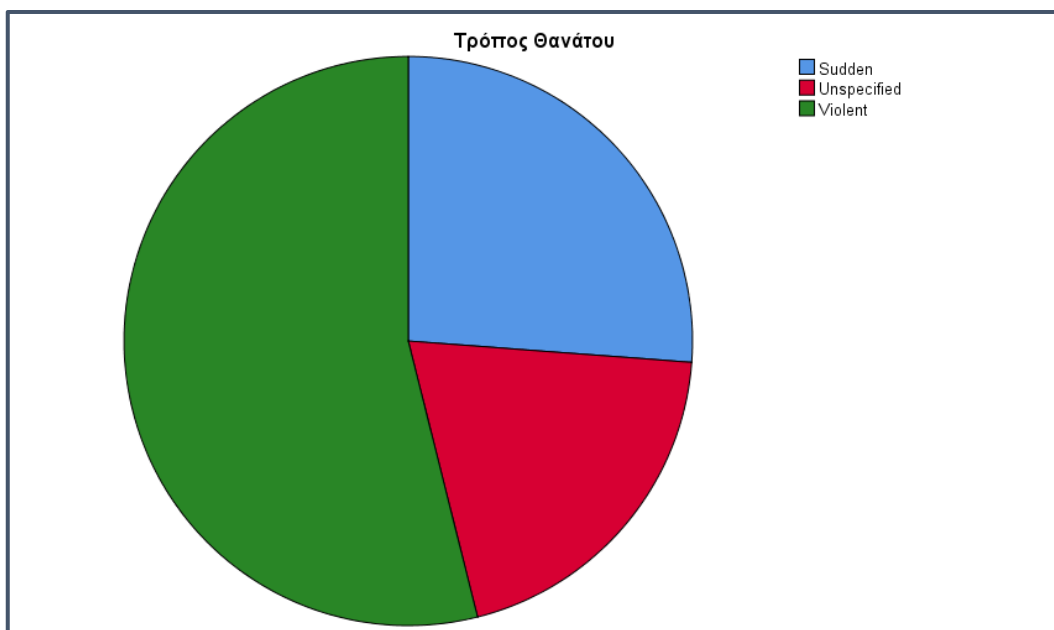
στη συγκέντρωση της ακετόνης είναι 0,03 mg/dL και η μέγιστη 46,00 mg/dL (STD : 5,70). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 5,77 mg/dL (STD : 1,23).

Όσον αφορά στους βίαιους θανάτους, η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι τα 0,07 g/L, και η μέγιστη τα 6,79 g/L (STD : 1,22). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης είναι 0,00 mg/dL και η μέγιστη 16,43 mg/dL (STD : 2,05). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 881,00 mg/dL (STD : 81,42). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0,17 mg/dL και η μέγιστη 11,88 mg/dL (STD : 2,27). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 1,31 mg/dL (STD : 0,30). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,24 mg/dL (STD : 0,05). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 6,82 mg/dL (STD : 1,82). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,05 mg/dL (STD : 0,01). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 0,05 mg/dL (STD : 0,01). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακετόνης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 11,43 mg/dL (STD : 1,07). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 5,73 mg/dL (STD : 0,94).

Πίνακας 25. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση των τρόπο θανάτου : Sudden (αιφνίδιος) - Unspecified (Αδιευκρίνιστος) - Violent (Βίαιος)

Τρόπος Θανάτου

	Frequency	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
Sudden	137	26,2	26,2	26,2
Unspecified	104	19,9	19,9	46,1
Violent	282	53,9	53,9	100,0
Total	523	100,0	100,0	



Σχήμα 38. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση τον τρόπο θανάτου.

Πίνακας 26. Επίδραση του τρόπου θανάτου στη συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων στο αίμα

	Τρόπος Θανάτου														
	Αιφνίδιος					Αδιευκρίνιστος					Βίαιος				
	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range
Αιθανόλη	1,14	6,24	0,06	1,30	6,18	0,83	4,23	0,08	0,85	4,15	1,47	6,79	0,07	1,22	6,72
1-προπανόλη	1,68	49,22	0,00	5,22	49,22	4,35	30,70	0,01	5,04	30,69	0,73	16,43	0,00	2,05	16,43
2-προπανόλη	0,56	3,11	0,01	0,76	3,10	2,30	40,47	0,01	6,27	40,46	8,08	881,00	0,01	81,42	880,99
Μεθανόλη	5,81	44,43	0,75	11,70	43,68	8,59	58,47	0,26	15,88	58,21	1,83	11,88	0,17	2,27	11,71
Οξικός Αιθυλεστέρας	0,07	0,38	0,01	0,12	0,37	0,18	0,55	0,01	0,17	0,54	0,10	1,31	0,01	0,30	1,30
Ισοβουτανόλη	0,03	0,08	0,01	0,02	0,07	0,06	0,21	0,02	0,05	0,19	0,05	0,24	0,01	0,05	0,23
1-βουτανόλη	0,25	1,26	0,01	0,36	1,26	1,61	23,14	0,01	4,19	23,13	0,77	6,82	0,01	1,82	6,82
3-μεθυλ-βουτανόλη	0,07	0,31	0,01	0,11	0,30	0,07	0,31	0,00	0,11	0,31	0,02	0,05	0,01	0,01	0,05
2-μεθυλ-βουτανόλη	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05	0,24	0,01	0,08	0,24	0,04	0,05	0,02	0,01	0±,03
Ακετόνη	0,69	9,68	0,03	1,47	9,65	1,77	46,00	0,03	5,70	45,97	0,37	11,43	0,02	1,07	11,41
Ακεταλδεΐδη	0,50	6,84	0,01	1,00	6,83	0,73	5,77	0,01	1,23	5,76	0,57	5,73	0,01	0,94	5,72

3.3.12 Μελέτη Επίδρασης του Βαθμού Σήψης στη Συγκέντρωση Πτητικών

Ενώσεων στο Νεκροτομικό Αίμα

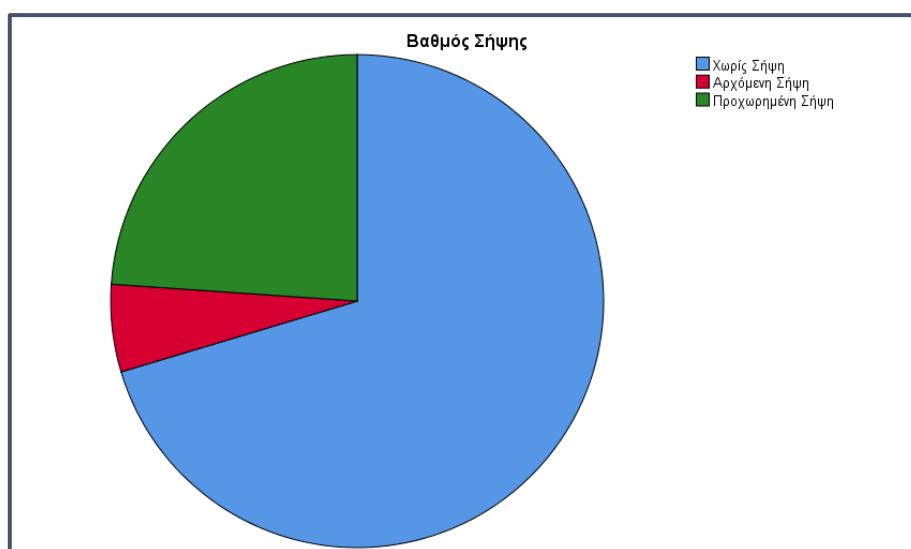
Από τα 523 περιστατικά, τα 368 εμφανίζονται χωρίς ίχνη σήψης. Στα 30 εντοπίζονται φαινόμενα αρχόμενης σήψης, ενώ στα λοιπά 125, η σήψη είναι προχωρημένη.

Όσον αφορά στα περιστατικά που δεν εμφανίζουν ίχνη σήψης, η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι τα 0,06 g/L, και η μέγιστη τα 6,79 g/L ($\pm 1,29$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης είναι 0,00 mg/dL και η μέγιστη 16,43 mg/dL ($\pm 1,96$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 881,00 mg/dL ($\pm 70,07$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0,17 mg/dL και η μέγιστη 44,43 mg/dL ($\pm 6,59$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 1,31 mg/dL ($\pm 0,21$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,17 mg/dL ($\pm 0,04$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 6,82 mg/dL ($\pm 1,63$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,31 mg/dL ($\pm 0,09$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,05 mg/dL ($\pm 0,02$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακετόνης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 11,43 mg/dL ($\pm 1,12$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 6,84 mg/dL ($\pm 0,87$).

Όσον αφορά στα περιστατικά που εμφανίζουν ίχνη αρχόμενης σήψης, η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της αιθανόλης είναι τα 0,07 g/L, και η μέγιστη τα 3,03 g/L ($\pm 0,75$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-προπανόλης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 6,20 mg/dL ($\pm 1,71$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-προπανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 6,64 mg/dL ($\pm 1,56$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0,75 mg/dL και η μέγιστη 6,04 mg/dL ($\pm 2,89$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,01 mg/dL ($\pm 0,00$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,01 mg/dL ($\pm 0,00$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι 0,04 mg/dL και η μέγιστη 0,09 mg/dL ($\pm 0,03$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 0,03 mg/dL ($\pm 0,01$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της 2-μεθυλο-βουτανόλης είναι 0,02 mg/dL και η μέγιστη 0,02 mg/dL ($\pm 0,00$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακετόνης είναι 0,06 mg/dL και η μέγιστη 9,68 mg/dL ($\pm 2,45$). Η ελάχιστη τιμή στη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης είναι 0,01 mg/dL και η μέγιστη 3,79 mg/dL ($\pm 0,94$).

Πίνακας 27. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση το βαθμό σήψης : Χωρίς Σήψη - Αρχόμενη Σήψη - Προχωρημένη Σήψη

Βαθμός Σήψης				
	Frequency	Percent (%)	Valid Percent (%)	Cumulative Percent (%)
Χωρίς Σήψη	368	70,4	70,4	70,4
Αρχόμενη Σήψη	30	5,7	5,7	76,1
Προχωρημένη Σήψη	125	23,9	23,9	100,0
Total	523	100,0	100,0	



Σχήμα 39. Ταξινόμηση των περιστατικών με βάση το βαθμό σήψης.

Πίνακας 28. Ταξινόμηση των περιστατικών βάσει του βαθμού σήψης τους. Στον πίνακα αναγράφονται και τα στατιστικά στοιχεία των πτητικών ενώσεων που εντοπίστηκαν στα περιστατικά αυτά

	Βαθμός Σήψης														
	Χωρίς Σήψη					Αρχόμενη Σήψη					Προχωρημένη Σήψη				
	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range	Mean	Maximum	Minimum	Standard Deviation	Range
Αιθανόλη	1,48	6,79	0,06	1,29	6,73	0,70	3,03	0,07	0,75	2,96	0,72	4,55	0,08	0,74	4,48
1-προπανόλη	0,56	16,43	0,00	1,96	16,43	1,17	6,20	0,02	1,71	6,18	5,06	49,22	0,02	6,28	49,20
2-προπανόλη	6,19	881,00	0,01	70,07	880,99	0,62	6,64	0,01	1,56	6,63	1,98	40,47	0,01	5,88	40,46
Μεθανόλη	2,89	44,43	0,17	6,59	44,26	2,72	6,04	0,75	2,89	5,29	7,86	58,47	0,26	15,09	58,21
Οξικός Αιθυλεστέρας	0,07	1,31	0,01	0,21	1,30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,22	1,16	0,01	0,28	1,15
Ισοβουτανόλη	0,04	0,17	0,01	0,04	0,16	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,07	0,24	0,01	0,06	0,23
1-βουτανόλη	0,74	6,82	0,01	1,63	6,82	0,06	0,09	0,04	0,03	0,05	1,31	23,14	0,01	3,77	23,13
3-μεθυλ-βουτανόλη	0,04	0,31	0,01	0,09	0,30	0,02	0,03	0,01	0,01	0,02	0,06	0,31	0,00	0,09	0,31
2-μεθυλ-βουτανόλη	0,03	0,05	0,01	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	.	0,00	0,05	0,24	0,01	0,08	0,24
Ακετόνη	0,44	11,43	0,02	1,12	11,41	1,00	9,68	0,06	2,45	9,62	1,52	46,00	0,03	5,21	45,97
Ακεταλδεΐδη	0,50	6,84	0,01	0,87	6,84	0,63	3,79	0,01	0,94	3,78	0,83	5,98	0,01	1,36	5,97

3.3.13 Προσδιορισμός Πτητικών Ενώσεων σε άλλα Νεκροτομικά Βιολογικά

Υλικά

Εντοπίστηκαν 14 δείγματα ούρων, θετικά σε αιθανόλη. Από αυτά, τα 12 δείγματα ούρων αντιστοιχούν σε περιστατικά που δεν εμφανίζουν κανένα ίχνος σήψης, και τα 2, σε δείγματα με προηγμένη σήψη. Τα 8 δείγματα αφορούν σε βίαιους θανάτους, τα 6 σε αιφνίδιους θανάτους. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης είναι 5,53 g/L, και αφορά σε περιστατικό αιφνίδιου θανάτου και χωρίς ενδείξεις σήψης, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν άλλες πτητικές ενώσεις. Η ελάχιστη είναι ίση με 0,11 g/L και αφορά σε περιστατικό βίαιου θανάτου και χωρίς ενδείξεις σήψης, και συγκέντρωση 1-προπανόλης ίση με 0,83 mg/dL.

Εντοπίστηκαν, ακόμη, 6 δείγματα στομαχικού περιεχομένου. Από αυτά, τα 5 δείγματα στομαχικού περιεχομένου αντιστοιχούν σε περιστατικά που δεν εμφανίζουν κανένα ίχνος σήψης, και το 1, σε δείγμα με προηγμένη σήψη. Τα 3 δείγματα αφορούν σε βίαιους θανάτους, τα 2 σε αιφνίδιους θανάτους και το 1 σε αδιευκρίνιστο. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης είναι 2,20 g/L, και αφορά σε περιστατικό βίαιου θανάτου και χωρίς ενδείξεις σήψης. Η ελάχιστη είναι ίση με 0,09 g/L και αφορά σε περιστατικό βίαιου θανάτου και χωρίς ενδείξεις σήψης, με συγκέντρωση 1-προπανόλης 0,24 mg/dL και 2-προπανόλης 0,18 mg/dL.

Επιπλέον, καταγράφηκαν 4 δείγματα υαλοειδούς υγρού. Από αυτά, το 1 δείγμα υαλοειδούς υγρού αντιστοιχεί σε περιστατικό που δεν εμφανίζει κανένα ίχνος σήψης, 1 σε δείγμα που εμφανίζει αρχόμενη σήψη και 2 σε δείγματα με προηγμένη σήψη. Τα 3 δείγματα αφορούν σε βίαιους θανάτους, και το 1 σε αδιευκρίνιστο. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης είναι 1,45 g/L, και αφορά σε περιστατικό αδιευκρίνιστου θανάτου και με προχωρημένη σήψη. Η ελάχιστη είναι ίση με 0,26 g/L και αφορά σε περιστατικό βίαιου θανάτου και με προχωρημένη σήψη.

Τέλος, μελετήθηκαν ένα ιστοτεμάχιο πνεύμονα και ένα ήπατος. Από τα περιστατικά αυτά, δεν ήταν δυνατή η συλλογή άλλου βιολογικού υλικού. Το ιστοτεμάχιο πνεύμονα παρελήφθη από περιστατικό αδιευκρίνιστου θανάτου, σε προχωρημένη σήψη. Η συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 0,63 g/L, της 1-προπανόλης 0,06 mg/dL και της ακετόνης 0,94 mg/dL. Το ιστοτεμάχιο ήπατος παρελήφθη από περιστατικό βίαιου θανάτου, χωρίς ενδείξεις σήψης. Η συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 0,22 g/L, της 1-προπανόλης 0,15 mg/dL και της ακετόνης 0,11 mg/dL και της ακεταλδεϋδης 0,08 mg/dL.

Συζήτηση

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε διάφορα βιολογικά υλικά αποτελεί την πιο συχνή ανάλυση που διενεργείται στα διαπιστευμένα εργαστήρια Τοξικολογίας. Η αιθανόλη μπορεί να προέρχεται από κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, ενώ είναι πιθανό να παραχθεί μεταθανάτια, κατά τη σήψη, από τους μικροοργανισμούς που λαμβάνουν δράση. Τα κυριότερα βακτήρια που συνεισφέρουν στη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης είναι : *Clostridium perfringens*, *enterobacteria* (ειδικότερα, *Escherichia coli*, *Klebsiella* και *Proteus species*), *micrococcaceae* (κυρίως *Staphylococcus aureus*), *streptococci* (κυρίως *Streptococcus faecalis* και μη αιμολυτικοί *streptococci*) και *Bacillus species* (κυρίως *Bacillus subtilis*) (CORRY, 1978). Οι κυριότεροι μύκητες είναι : *Candida albicans* (και λοιπά είδη *Candida*) και *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces species*) (Velivasi, Kourkoumelis, et al., 2021; Velivasi, Sakkas, et al., 2021b). Σε σπάνιες περιπτώσεις, το αλκοόλ παράγεται ενδογενώς, εξαιτίας του συνδρόμου «Auto-brewery Syndrome». Τέλος, δύναται να παραχθεί στα δείγματα, κατά την αποθήκευσή τους (Ziavrou et al., 2005).

Στη Δικαστική Τοξικολογία, ο αποσαφηνισμός της προέλευσης της αιθανόλης σε «μεταθανάτια παραγωγή» και «εν ζωή κατάποση», κατέχει ξεχωριστό κεφάλαιο. Αυτός είναι και ο σκοπός της προκείμενης διπλωματικής εργασίας, μαζί με την εύρεση πιθανών δεικτών, που θα μπορούσαν να αποδείξουν την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης, στο νεκροτομικό δείγμα.

Ορισμένες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μεταθανάτιες πληροφορίες για τη συγκέντρωση του αλκοόλ στο αίμα, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα αιθανόλης στον οργανισμό, πριν την ώρα θανάτου, ή την ποσότητα αλκοόλ που καταναλώθηκε πριν από θανάτους που σχετίζονται με τραυματισμό (Conner et al., 2016; Greene et al., 2020). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές εάν η μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα είναι έγκυρος δείκτης για αυτά τα συμπεράσματα. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στο αίμα, πριν και μετά το θάνατο, μπορεί να διαφέρουν λόγω του μεταβολισμού του αλκοόλ (Kelly & Mozayani, 2012), των ζητημάτων μέτρησης και των συνθηκών που περιβάλλουν έναν θάνατο (π.χ. περιβαλλοντικές συνθήκες και χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ του θανάτου και της νεκροψίας-νεκροτομής) (Kugelberg & Jones, 2007), και της χορήγησης ενδοφλέβιων υγρών, καθώς και των μεταγγίσεων αίματος κατά τη διάρκεια της φροντίδας κάποιου τραύματος (A. W. Jones, 2015).

Λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει διαφορές στα μεταθανάτια και προθανάτια επίπεδα αιθανόλης στο αίμα, μεταξύ δειγμάτων που έχουν προέλθει από βίαιους θανάτους, και τραυματισμούς. Μια τέτοια αναδρομική μελέτη 39 αποθανόντων που εισήχθησαν σε νοσοκομείο και εξετάστηκαν από το Ιατρικό Εξεταστή της Κομητείας του Σαν Ντιέγκο και οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί στο αλκοόλ βρήκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δυο συγκεντρώσεων αιθανόλης (Saitman et al., 2015). Το ίδιο δείγμα αίματος, του οποίου η παραλαβή είχε γίνει προθανάτια, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της BAC κάθε ατόμου σε δύο ξεχωριστές στιγμές - στο νοσοκομείο πριν από το θάνατο και στη συνέχεια κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής. Όταν τα δείγματα προθανάτιου αίματος που εξετάστηκαν μετά τον θάνατο, τα επίπεδα ήταν κατά μέσο όρο 14% χαμηλότερα από τα αρχικά επίπεδα.

Στην παρούσα εργασία, ως πιθανοί βιοδείκτες ελέγχθηκαν στα βιολογικά υλικά, και κυρίως στο αίμα, οι εξής πτητικές ενώσεις : αιθανόλη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, ακετόνη και ακεταλδεΐδη. Ορισμένες από αυτές υπάρχουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό, ως φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού (Kalapos, 2003; Barry K. Logan et al., 1994; Wu et al., 1995), ενώ κάποιες προκύπτουν κατά τις εξεργασίες σήψης, αφού επέλθει ο θάνατος (Nanikawa et al. 1974, Corry 1978, Zumwalt et al. 1982, Caplan et al. 1990, Kuhlman et al. 1991, Mayes et al. 1992, Canfield et al. 1993, Gilliland et al. 1993, Videira de Lima et al. 1999, Hadley et al. 2003, Johnson et al. 2004, Moriya et al. 2004, Lewis et al. 2004). Η αιθανόλη είναι χαρακτηριστική ένωση της εν λόγω κατηγορίας, αφού, όπως συζητήθηκε νωρίτερα, προέρχεται είτε από κατάποση αλκοολούχων ποτών, είτε από τη μεταθανάτια δράση των μικροοργανισμών στο πτώμα.

Η 1-προπανόλη, υποστηρίζεται από αρκετούς για την αξία της ως βιοδείκτης μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης, αφού η προέλευσή της είναι κατά κύριο λόγο αποτέλεσμα της μικροβιακής δράσης μετά θάνατον. Ακόμη, είναι πιθανό, αλλά πολύ σπάνιο, να περιέχεται σε αλκοολούχα ποτά, μαζί τις υπόλοιπες αλκοόλες υψηλού μοριακού βάρους. Στην τελευταία περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης είναι, κατά μέσο όρο, 0,042 mg/dL, όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης αγγίζει τα 1,22 g/L. Σημειώνεται, δε, ότι η προθανάτια παραγωγή 1-προπανόλης είναι αμελητέα (έως 0,0048 mg/dL, στον ορό αίματος). Τέλος, η κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν 1-προπανόλη, αποδίδει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του πτητικού στο νεκροτομικό βιολογικό υλικό. Συνεπώς, με το «κριτήριο της 1-προπανόλης», αποδεικνύεται ότι για συγκεντρώσεις 1-προπανόλης, μεγαλύτερες από 0,104 mg/dL, τα

νεκροτομικά δείγματα, μπορούν να σημανθούν θετικά για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (V. Boumba et al., 2019).

Στα αποτελέσματα που προέκυψαν από την από εν λόγω διατριβή, υπήρξαν 33, από τα συνολικά 85 δείγματα αίματος θετικά για αιθανόλη (38,8%), που παρελήφθησαν από κλινικά περιστατικά. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης ήταν 0,0807 ($\pm 0,04488$) mg/dL, και έρχεται σε σχετική συμφωνία με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Η πλειοψηφία των δειγμάτων αυτών, αφορά σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Αντίστοιχα, από τα 523 νεκροτομικά δείγματα θετικά για αιθανόλη, τα 443 (84,7%) περιείχαν 1-προπανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 1,76 mg/dL ($\pm 4,09910$), με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να εντοπίζονται σε δείγματα με προχωρημένη σήψη. Συνεπώς, παρατηρείται και πάλι, πως η 1-προπανόλη αποτελεί πολύ καλό δείκτη για τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης.

Η ακετόνη υπάρχει στον ανθρώπινο οργανισμό, και δύσκολα μπορεί να συνδεθεί με την αιθανόλη. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, παρατηρείται σε άτομα που βρίσκονταν σε κατάσταση νηστείας, πριν τη δειγματοληψία. Επιπλέον, η συγκέντρωση της ακετόνης μπορεί να αυξηθεί λόγω δηλητηρίασης από βαρβιτουρικά ή αλκοόλ, υποθερμία, μεταβολική κετοξέωση, καθώς και δηλητηρίαση από 2-προπανόλη (Canfield et al., 1998). Σε φυσιολογικά άτομα, η συγκέντρωση ακετόνης αγγίζει τα 0,03 – 0,09 mg/dL, και σε άτομα με διαβήτη πάνω από 0,18 mg/dL. Επίσης, τα επίπεδα ακετόνης μετριούνται κυρίως στην αναπνοή, και όχι στο αίμα ή άλλο βιολογικό υλικό, γιατί εκεί παρουσιάζεται σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις (Alkedeh & Priefer, 2021; Obeidat, 2021). Στα δείγματα 85 κλινικών περιστατικών, εντοπίστηκαν 81 (95,3%) με ακετόνη. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της ακετόνης ήταν 0,22 ($\pm 0,144$) mg/dL, και εμφανίζεται με συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L. Αντίστοιχα, στα δείγματα νεκροτομικού αίματος, η ακετόνη ήταν παρούσα στα 470 (89,9%) από τα 523 δείγματα θετικά για αιθανόλη. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της ακετόνης ήταν 0,72 ($\pm 2,77$) mg/dL. Ωστόσο, ούτε και η ακετόνη μπορεί να χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης, είτε για την κατανάλωση, είτε για τη μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης.

Επιπλέον, η 2-προπανόλη ανιχνεύεται σε όχι ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό των κλινικών περιστατικών (21/85 περιστατικά, 24,5%), και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με μέσο όρο 0,05 ($\pm 0,246$) mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης για αυτές τις τιμές, κυμαίνονται, κατά μέσο όρο, μεταξύ των 0,5 g/L και 3,0 g/L. Αντίστοιχα, στα δείγματα νεκροτομικού αίματος, η 2-προπανόλη ήταν παρούσα στα 269 από τα 523 (51,4%) δείγματα θετικά για αιθανόλη. Ο μέσος

όρος των συγκεντρώσεων της 2-προπανόλης ήταν 4,36 (\pm 53,78) mg/dL, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να εντοπίζονται σε πτώματα χωρίς σήψη ή σε στάδια αρχόμενης σήψης, και για συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Αυτές οι συγκεντρώσεις αιθανόλης αναφέρονται, ως επί το πλείστον σε αλκοόλ που έχει καταναλωθεί. Ενδεχομένως να μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης η 2-προπανόλη, στα νεκροτομικά δείγματα, αν μπορούσε να ξεπεραστεί το πρόβλημα της χημικής αστάθειάς της, μιας και μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε ακετόνη, και επηρεάζει την ανάλυση της αιθανόλης (A. W. Jones, 1997). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα, που να στηρίζουν αυτή την υπόθεση.

Η ακεταλδεΰδη, πρόκειται για το βασικό μεταβολίτη της αιθανόλης, και παράγεται από τη δράση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση, ενώ στη συνέχεια σε οξικό οξύ, από την αλδεϋδική αφυδρογονάση. Σε φυσιολογικές συνθήκες και έπειτα από κατανάλωση αιθανόλης ίσης με 0,5 g/L, η συγκέντρωση ακεταλδεΰδης υπολογίζεται μεταξύ 0,56 – 1,1 mg/dL (Stornetta et al., 2018). Στα δείγματα κλινικών περιστατικών που είναι θετικά για αιθανόλη, εμφανίζεται στα 79 από τα 85 (92,9%) δείγματα, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,32 (\pm 0,493) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης τόσο μικρότερες από 0,1 g/L, όσο και μεταξύ 0,1 g/L και 3,0 g/L. Αντίστοιχα, στα νεκροτομικά δείγματα, εντοπίζεται στα 476 από τα 523 (91%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,58 (\pm 1,02) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Η ακεταλδεΰδη μπορεί να υποδείξει την κατανάλωση αιθανόλης, σε κλινικά δείγματα, ωστόσο δεν είναι ιδιαίτερα έγκυρη για τα νεκροτομικά δείγματα, εκτός αν έχει περάσει μικρό χρονικό διάστημα από τη στιγμή της κατανάλωσης αλκοόλ, και της ανάλυσης. Είναι αρκετά ευαίσθητη και όχι σταθερή, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σύντομα σε οξικό οξύ.

Η μεθανόλη, είναι το βασικό συστατικό των νοθευμένων αλκοολούχων ποτών. Ακόμη και αν υπάρχει και σε μη νοθευμένα αλκοολούχα ποτά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, υπάρχει περίπτωση να ανέρχεται σε ποσότητα 18 g/L. Αυτό, σημαίνει ότι σε αλκοολούχο ποτό με 40% αιθανόλη, βρίσκεται 0,72% (ν/ν) μεθανόλη. Όσον αφορά στο μεταβολισμό της από τον ανθρώπινο οργανισμό, η μεθανόλη τείνει να παραμένει στον οργανισμό αναλλοίωτη, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μέχρι να καταβολιστεί η αιθανόλη. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι η αναστολή του μεταβολισμού της μεθανόλης από την αιθανόλη θα συμβεί μετά από κατανάλωση σχετικά μικρής ποσότητας αιθανόλης. Επίσης, είναι η κύρια αιτία που προκαλεί το hangover, μαζί με τη μεγάλη συγκέντρωση ακεταλδεΰδης (Mackus et al., 2020). Στα δείγματα κλινικών περιστατικών, δεν εντοπίστηκε μόνο στα 9 από τα 85, συνεπώς δεν μπορεί να αποδοθεί στατιστικά σημαντική απάντηση για αυτόν τον πληθυσμό. Πιθανότατα, τα

αλκοολούχα ποτά που καταναλώθηκαν ήταν νοθευμένα, μιας και ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της μεθανόλης είναι 2,10 ($\pm 4,15$) mg/dL. Αντίστοιχα, στα νεκροτομικά δείγματα, εντοπίζεται στα 67 από τα 523 (12,8%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 4,21 ($\pm 9,67$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης σε αυτά τα δείγματα, εμφανίζεται μεγαλύτερη σε αυτά που προέρχονται από πτώμα σε προχωρημένη σήψη. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι συγκέντρωση της μεθανόλης αυξάνεται με την πάροδο των εξεργασιών της σήψης. Συνεπώς, δεν μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο βιοδείκτη για την κατανάλωση της αιθανόλης, στο νεκροτομικό αίμα.

Ο οξικός αιθυλεστέρας εντοπίζεται σε μόλις 5 από τα 85 (5,88%) δείγματα κλινικών περιστατικών, που είναι θετικά σε αιθανόλη. Ακόμη, η μέση συγκέντρωσή του είναι 0,0091 ($\pm 0,00206$) mg/dL. Αντίστοιχα, στα νεκροτομικά δείγματα, εντοπίζεται μόλις στα 62 από τα 523 (11,9%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,11 ($\pm 0,238$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Η εμφάνισή του γίνεται κυρίως σε δείγματα που εμφανίζουν προχωρημένα φαινόμενα σήψης, συνεπώς είναι πτητική ένωση που παράγεται κυρίως μεταθανάτια. Η εξαγωγή συμπερασμάτων, τόσο για τα κλινικά, όσο και για τα νεκροτομικά δείγματα, δεν είναι ασφαλής, δεδομένου του μικρού πλήθους εμφάνισης του οξικού αιθυλεστέρα.

Οι ανώτερες αλκοόλες ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη και 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα κλινικών περιστατικών. Καταρχήν αποτελούν βιοδείκτες της μεταθανάτιας μικροβιακής δραστηριότητας και των εξεργασιών σήψης, ενώ έχουν καταστρωθεί μαθηματικά μοντέλα για την μεταθανάτια παραγωγή τους (Velivasi, Kourkoumelis, et al., 2021; Velivasi, Sakkas, et al., 2021a). Η ισοβουτανόλη, εντοπίζεται στα 59 από τα 523 (11,3%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,0497 ($\pm 0,0485$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Στα 7 (11,9%) δείγματα, στα οποία υπολογίζεται συγκέντρωση της αιθανόλης μεγαλύτερη από 3,0 g/L, το μεγαλύτερο ποσοστό της προέρχεται από κατανάλωση, ενώ η ισοβουτανόλη υπολογίζεται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1 mg/dL και 0,5 mg/dL. Η εμφάνισή της γίνεται κυρίως σε δείγματα που εμφανίζουν προχωρημένα φαινόμενα σήψης, και δευτερευόντως σε δείγματα που δεν εμφανίζουν φαινόμενα σήψης. Σε δείγματα που παρουσιάζουν αρχόμενη σήψη, η συγκέντρωση της ισοβουτανόλης είναι πολύ μικρή. Επομένως, υπάρχει πιθανή συσχέτιση της ισοβουτανόλης με την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης.

Η 1-βουτανόλη εντοπίζεται στα 62 από τα 523 (11,9%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 1,07 ($\pm 3,131$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,1 g/L και 0,5 g/L. Η εν λόγω συγκέντρωση αιθανόλης είναι η συνηθισμένη για τις περιπτώσεις που αυτή παράγεται μεταθανάτια. Σε 25 (40%) δείγματα, η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από 0,5 g/L, για τα οποία μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η αιθανόλη έχει καταναλωθεί. Η εμφάνισή της γίνεται κυρίως σε δείγματα που εμφανίζουν προχωρημένα φαινόμενα σήψης, και δευτερευόντως σε δείγματα που δεν εμφανίζουν φαινόμενα σήψης. Σε δείγματα που παρουσιάζουν αρχόμενη σήψη, η συγκέντρωση της 1-βουτανόλης είναι πολύ μικρή. Επομένως, υπάρχει πιθανή συσχέτιση της 1-βουτανόλης με την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης.

Η 3-μεθυλο-βουτανόλη εντοπίζεται μόλις στα 25 από τα 523 (4,78%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,0498 ($\pm 0,0857$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Η εμφάνισή της γίνεται σχεδόν σε ίδια επίπεδα σε δείγματα που εμφανίζουν προχωρημένα φαινόμενα σήψης καθώς και κανένα φαινόμενο σήψης. Σε δείγματα που παρουσιάζουν αρχόμενη σήψη, η συγκέντρωση της 3-μεθυλο-βουτανόλης είναι πολύ μικρή. Σε 14 (56%) δείγματα η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από 0,5 g/L, γεγονός που υποδεικνύει την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης. Επομένως, υπάρχει πιθανή συσχέτιση της 3-μεθυλο-βουτανόλης με την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης.

Η 2-μεθυλο-βουτανόλη εντοπίζεται μόλις στα 13 από τα 523 (2,48%) δείγματα θετικά για αιθανόλη, με μέσο όρο συγκεντρώσεων 0,0423 ($\pm 0,06524$) mg/dL, και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης κυρίως μεταξύ 0,5 g/L και 3,0 g/L. Η εμφάνισή της γίνεται κυρίως σε δείγματα που εμφανίζουν προχωρημένα φαινόμενα σήψης, ενώ τα επίπεδα συγκέντρωσής της σε δείγματα χωρίς σήψη, ή με αρχόμενη σήψη, είναι πολύ κοντά. Σε 12 (92,3%) δείγματα η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από 0,5 g/L, γεγονός που υποδεικνύει την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης. Επομένως, υπάρχει πιθανή συσχέτιση της 2-μεθυλο-βουτανόλης με την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα για την ισοβουτανόλη, την 1-βουτανόλη, την 2-μεθυλο-βουτανόλη και την 3-μεθυλο-βουτανόλη έρχονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Σύμφωνα με αυτά, οι ανώτερες αλκοόλες, και ειδικότερα η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη, χαρακτηρίζονται ως οι σημαντικότερες για την ανάλυση των συγγενών αλκοολών, με τις μεθυλο-βουτανόλες να είναι δευτερεύουσας σημασίας, εξαιτίας της μικρής

τους συγκέντρωσης (Bonte, 1987). Για την καλύτερη διάκριση της καταναλωθείσας αιθανόλης, από την παραγόμενη μεταθανάτια, προτείνεται η ανάλυση με τα αντίστοιχα μαθηματικά μοντέλα, τα οποία μπορούν να υποδείξουν και τους μικροοργανισμούς που έχουν δράσει, και έχουν παράξει τις εν λόγω πτητικές ενώσεις (Velivasi, Sakkas, et al., 2021a, 2021b).

Σε σύγκριση με τους λοιπούς βιοδείκτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και αποτελούν προϊόντα του μη-οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης, η ανάλυση των ανώτερων αλκοολών φαίνεται να υπερέχει. Σημαντικότερο πλεονέκτημά της αποτελεί η ευκολία στην ανάλυση των δειγμάτων. Χρησιμοποιείται αέρια χρωματογραφία υπερκείμενου χώρου, με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (HS-GC-FID), μια τεχνική αρκετά απλή, που δεν απαιτεί προκατεργασία των δειγμάτων (Ceciliason et al., 2021). Ακόμη, προσδιορίζεται άμεσα η αιθανόλη και ο μεταβολίτης της, ακεταλδεϋδη, με μια σχετικά καλή αναλογία χρόνου κατανάλωσης αιθανόλης και χρόνου ανίχνευσης.

Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, ανιχνεύονται στο αίμα και τις τρίχες και παραμένουν ανιχνεύσιμοι έως και για 24 ώρες. Σε αλκοολικά άτομα, μπορεί να είναι ανιχνεύσιμοι έως και για 99 ώρες (Auwärter et al., 2001). Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγονται οι μικρές συγκεντρώσεις των FAEEs σε άτομα που δεν καταναλώνουν συχνά αλκοόλ, ενώ ακόμη, οι FAEEs είναι ενδογενείς χημικές ενώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Liu et al., 2018).

Οι μεταβολίτες της σεροτονίνης, 5-HTOL/5-HIAA είναι αυξημένοι στο αίμα τέσσερις έως επτά ώρες μετά το τέλος της πρόσληψης αλκοόλ και έως και ογδόντα ώρες αυτό είναι ακόμα ανιχνεύσιμο. Το μειονέκτημα της χρήσης της εν λόγω αναλογίας 5-HTOL/5- HIAA ως δείκτη κατανάλωσης αιθανόλης είναι ότι η αναλογία είναι δύσκολο να ερμηνευτεί και επομένως δεν είναι πολύ χρήσιμο στη διάκριση μεταξύ κοινωνικής και υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ (Liu et al., 2018).

Παλιότερα, η φωσφατιδυλοαιθανόλη (PEth), θεωρούνταν πολύ καλός δείκτης κατανάλωσης αιθανόλης, λόγω της γραμμικότητας που εμφάνιζε η συγκέντρωσή της στο αίμα, με τη συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ δεν επηρεάζεται από την τυχαία έκθεση σε αιθανόλη. Ακόμη, είναι ανιχνεύσιμη για αρκετές ημέρες μετά την κατανάλωση. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί η συντήρηση των δειγμάτων αίματος, μιας και η PEth δεν είναι σταθερή σε όλες τις θερμοκρασίες, με συνέπεια να προκύπτει σφάλμα στα αποτελέσματα των μετρήσεων.(Casati et al., 2019; Gnann et al., 2012; Liu et al., 2018).

Το αιθυλογλυκουρονίδιο, σχηματίζεται μόνο παρουσία αιθανόλης στον ανρθώπινο οργανισμό, ενώ ανιχνεύεται στο αίμα, τις τρίχες και τα ούρα. Περίπου το 0,5 – 1,6 % της συνολικής ποσότητας της αιθανόλης μετατρέπεται σε EtG, και είναι ανιχνεύσιμο στο αίμα για 6-18 ώρες. Στα μαλλιά, η EtG μπορεί να ανιχνευθεί για αρκετούς μήνες. Ωστόσο, οι πολύ χαμηλές ποσότητες καταναλωθείσας αιθανόλης δεν είναι ανιχνεύσιμες λόγω των επιπτώσεων των λουσιμάτων. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι επιθετικές θεραπείες μαλλιών μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Το μειονέκτημα της χρήσης του EtG ως δείκτη είναι ότι είναι τόσο ευαίσθητο που ακόμη και η τυχαία λήψη αλκοόλ, από πηγές όπως οι ωριμασμένες μπανάνες και η χρήση απολυμαντικών χεριών που περιέχουν οινόπνευμα, μπορεί να οδηγήσει σε θετικό αποτέλεσμα στα ούρα. Γι' αυτό είναι σημαντικό να επιλέγεται ένα καλό κατώφλι συγκεντρώσεων, προκειμένου να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι μπορεί να υπάρξει αποικοδόμηση του EtG μετά τη συλλογή όταν το δείγμα ούρων δεν αποθηκεύεται σωστά. Το *E. coli* και το *C. sordellii* είναι σε θέση να αποικοδομήσουν το EtG λόγω της δράσης τους στη β-γλυκουρονιδάση, με αποτέλεσμα ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Το φύλο, η ηλικία και η νεφρική λειτουργία έχουν επίσης κάποια επίδραση στην ποσότητα της EtG στα ούρα (Al-asmari et al., 2010; Biondi et al., 2019; Borucki et al., 2005; Ferraguti et al., 2017; Politi et al., 2007; Santunione et al., 2018; Wurst et al., 2003).

Όπως το EtG, ο θειικός αιθυλεστέρας σχηματίζεται μόνο παρουσία αιθανόλης. Περίπου το 0,1% της ποσότητας του αλκοόλ που προσλαμβάνεται συζευγνύεται με θειικό άλας που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό EtS και 0,010 - 0,016% της συνολικής ποσότητας αιθανόλης απεκκρίνεται στα ούρα καθώς το EtS. Το EtS φτάνει στη μέγιστη συγκέντρωση στα ούρα μετά τη μέγιστη δύο ώρες και μπορεί να μετρηθεί για μιάμιση ημέρα κατά την κατάποση 49 g αιθανόλης (Hegstad et al., 2017). Σε αντίθεση με το EtG, η ποσότητα του EtS στα ούρα δεν επηρεάζεται από την παρουσία βακτηρίων (Liu et al., 2018).

Συνεπώς, η εύρεση κάποιας συσχέτισης με τις πτητικές ενώσεις που ανιχνεύονται στο αίμα μεταθανάτια, με το αλκοόλ που έχει καταναλωθεί προθανάτια, θα μπορούσε να αποδώσει σημαντικό προβάδισμα στις τοξικολογικές αναλύσεις, δικαστικού ενδιαφέροντος. Η ανίχνευση με τη χρήση HS-GC-FID πρόκειται για μια εύκολη, γρήγορη και οικονομική διαδικασία. Το δείγμα δεν απαιτεί ιδιαίτερη προκατεργασία, ούτε καταστρέφεται από τη στιγμή της αξιολόγησής του και μετά. Ακόμη, η διενέργεια πολλαπλών ελέγχων σε ένα δείγμα, και χρησιμοποιώντας μια τεχνική, πάντα αποτελούσε ελκυστική ιδέα για τους αναλυτικούς χημικούς. Με την ανάλυση δείγματος αίματος με HS-GC-FID, είναι ικανός ο ταυτόχρονος

ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των δεικτών της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης, όσο και των δεικτών προθανάτιας κατανάλωσης αιθανόλης, σε νεκροτομικό βιολογικό υλικό. Τέλος, οι λοιποί μεταβολίτες (EtG, EtS, PEth, FAEEs, 5-HTOL/5-HIAA) της αιθανόλης, σπάνια αναλύονται σε νεκροτομικά υλικά.

Συμπεράσματα

- Η 1-προπανόλη στα νεκροτομικά δείγματα, αποτελεί δείκτη μεταθανάτιας παραγωγής της αιθανόλης. Εντοπίζεται στο 84,7% των περιστατικών, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε εκείνα που εμφανίζουν προχωρημένες εξεργασίες σήψης. Συνεπώς, δεν αποτελεί κατάλληλο βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης.
- Η ακετόνη εντοπίζεται στο 89,9% των περιστατικών, αλλά δεν μπορεί να συσχετιστεί με την κατανάλωση αιθανόλης, σε ήπιες ποσότητες. Κυρίως παράγεται από έπειτα από περίοδο νηστείας, κετοξέωση ή/και από δηλητηρίαση από το αλκοόλ. Ακόμη, σχηματίζεται από την 2-προπανόλη. Συνεπώς, δεν αποτελεί κατάλληλο βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης, αλλά ούτε και δείκτη μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης.
- Η 2-προπανόλη είναι ασταθής και μετατρέπεται γρήγορα σε ακετόνη. Ανιχνεύθηκε στο 51,4% των νεκροτομικών δειγμάτων, και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της αφορούν σε πτώματα χωρίς σήψη, ή με αρχόμενη σήψη. Στα εν λόγω δείγματα, η συγκέντρωση αιθανόλης αποδίδεται σε κατανάλωση, συνεπώς και η 2-προπανόλη, θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης, αν υπερνικηθούν οι περιορισμοί της. Τέλος, δεν μπορεί να είναι μοναδικός δείκτης μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης.
- Η ακεταλδεΐδη είναι ο βασικός οξειδωτικός μεταβολίτης της αιθανόλης, εντοπίζεται στο 91% των νεκροτομικών δειγμάτων και μπορεί να δώσει απάντηση για την προθανάτια κατανάλωση αιθανόλης, σε νεκροτομικό δείγμα, μόνο σε περιπτώσεις που η κατανάλωση αιθανόλης και ο χρόνος θανάτου, είναι κοντά.
- Η μεθανόλη εντοπίζεται στο 12,8% των νεκροτομικών δειγμάτων, και αποτελεί φυσικό συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Στα νοθευμένα ποτά, περιέχεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ακόμη, η συγκέντρωσή της αυξάνεται με την πρόοδο των σηπτικών εξεργασιών. Θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης, σε περιπτώσεις νοθευμένων ποτών, και σε περιστατικά χωρίς σηπτικές εξεργασίες.
- Ο οξικός αιθυλεστέρας συναντάται στο 11,9% των νεκροτομικών δειγμάτων, και κυρίως στα έντονα σηπτικά περιστατικά. Συνεπώς, δεν αποτελεί κατάλληλο βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης.
- Η ισοβουτανόλη εντοπίζεται στο 11,3% των νεκροτομικών δειγμάτων και κυρίως σε εκείνα με προχωρημένη σήψη. Εμφανίζεται και στο 11,8% των δειγμάτων, όπου η αιθανόλη προέρχεται από κατανάλωση. Για ένα μικρό ποσοστό άσηπτων περιστατικών, μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης
- Η 1-βουτανόλη εντοπίζεται στο 11,9% των νεκροτομικών δειγμάτων και κυρίως σε εκείνα με προχωρημένη σήψη. Εμφανίζεται και στο 40% των δειγμάτων, όπου η αιθανόλη

προέρχεται από κατανάλωση. Για ένα μικρό ποσοστό άσηπτων περιστατικών, μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης

- Η 3-μεθυλο-βουτανόλη εντοπίζεται στο 4,78% των νεκροτομικών δειγμάτων και κυρίως σε εκείνα με προχωρημένη σήψη. Εμφανίζεται και στο 56% των δειγμάτων, όπου η αιθανόλη προέρχεται από κατανάλωση. Για ένα μικρό ποσοστό άσηπτων περιστατικών, μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης
- Η 2-μεθυλο-βουτανόλη εντοπίζεται στο 2,48% των νεκροτομικών δειγμάτων και κυρίως σε εκείνα με προχωρημένη σήψη. Εμφανίζεται και στο 92,3% των δειγμάτων, όπου η αιθανόλη προέρχεται από κατανάλωση. Για ένα μικρό ποσοστό άσηπτων περιστατικών, μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες κατανάλωσης αιθανόλης
- Αναμένεται περαιτέρω διερεύνηση των περιπτώσεων των μεθυλο-βουτανολών, μιας και οι απαντήσεις που ελήφθησαν στην προκείμενη μελέτη, δεν είναι αντιπροσωπευτικές, εξαιτίας του μικρού δείγματος αναφοράς
- Με HS-GC-FID είναι ικανός ο προσδιορισμός τόσο βιοδεικτών μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης, όσο και κατανάλωσης αιθανόλης, σε νεκροτομικό βιολογικό υλικό.
- Οι δείκτες PEth, FAEEs, 5-HTOL/5-HIAA και N-ακετυλο-ταυρίνη, δεν αναλύονται μεταθανάτια.
- Οι βιοδείκτες EtG και EtS μπορούν να αναλυθούν μεταθανάτια, σε δείγμα τρίχας, αλλά είναι δύσκολη η ποσοτικοποίηση και η λήψη αξιόπιστου αποτελέσματος, εξαιτίας των προσμίξεων που εμφανίζουν.

Βιβλιογραφία

- Al-asmari, A. I., Anderson, R. A., & Appelblad, P. (2010). *Direct Determination of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Postmortem Urine Specimens Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry * Methods and Materials*. 34(June), 261–272.
- Al-Awadhi, A., Wasfi, I. A., Al Reyami, F., & Al-Hatali, Z. (2004). Autobrewing revisited: Endogenous concentrations of blood ethanol in residents of the United Arab Emirates. *Science and Justice - Journal of the Forensic Science Society*, 44(3), 149–152. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(04\)71707-4](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(04)71707-4)
- Alkedeh, O., & Priefer, R. (2021). The Ketogenic Diet: Breath Acetone Sensing Technology. In *Biosensors* (Vol. 11, Issue 1, p. 26). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/bios11010026>
- American Chemical Society. (2019). *History of the combination of gas chromatography and mass spectrometry - American Chemical Society*. American Chemical Society. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/gas-chromatography-mass-spectrometry.html>
- Amirav, A., Gordin, A., Poliak, M., & Fialkov, A. B. (2008). Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. In *Journal of Mass Spectrometry* (Vol. 43, Issue 2, pp. 141–163). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/jms.1380>
- Appenzeller, B. M. R., Schuman, M., & Wennig, R. (2008). Was a child poisoned by ethanol? Discrimination between ante-mortem consumption and post-mortem formation. *International Journal of Legal Medicine*, 122(5), 429–434. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0245-3>
- Auwärter, V., Sporkert, F., Hartwig, S., Pragst, F., Vater, H., & Diefenbacher, A. (2001). Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clinical Chemistry*, 47(12), 2114–2123. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2114>
- ÄYräpää, T. (1968). FORMATION OF HIGHER ALCOHOLS BY VARIOUS YEASTS. *Journal of the Institute of Brewing*, 74(2), 169–178. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1968.tb03111.x>
- Backer, R. C., Pisano, R. V., & Sopher, I. M. (1980). The Comparison of Alcohol Concentrations in Postmortem Fluids and Tissues. *Journal of Forensic Sciences*, 25(2), 12130J. <https://doi.org/10.1520/jfs12130j>
- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., Scotti, L., Jenab, M., Turati, F., Pasquali, E., Pelucchi, C., Galeone, C., Bellocco, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., & La Vecchia,

- C. (2015). Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, *112*(3), 580–593. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.579>
- Bagramyan, K., & Trchounian, A. (2003). Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 68, Issue 11, pp. 1159–1170). *Biochemistry (Mosc)*. <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000009129.18714.a4>
- Baliunas, D., Rehm, J., Irving, H., & Shuper, P. (2010). Alcohol consumption and risk of incident human immunodeficiency virus infection: A meta-analysis. *International Journal of Public Health*, *55*(3), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00038-009-0095-x>
- Bayoumy, A. B., Mulder, C. J. J., Mol, J. J., & Tushuizen, M. E. (2021). Gut fermentation syndrome: A systematic review of case reports. *United European Gastroenterology Journal*, *9*(3), 332–342. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12062>
- Biondi, A., Freni, F., Carelli, C., Moretti, M., & Morini, L. (2019). Ethyl glucuronide hair testing: A review. In *Forensic Science International* (Vol. 300, pp. 106–119). *Forensic Sci Int*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>
- Bonte, W. (1987). Begleitstoffe alkoholischer Getränke. In *Biogenese, Vorkommen, Pharmakologie, Physiologie und Begutachtung*. Schmidt-Romhild Lubeck. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027261846>
- Bonventre, J., Valanju, S., & Bastos, M. L. (1982). Evaluation of ethanol analysis on brain and liver by head-space gas chromatography. *Forensic Science International*, *19*(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(82\)90153-0](https://doi.org/10.1016/0379-0738(82)90153-0)
- Borucki, K., Schreiner, R., Dierkes, J., Jachau, K., Krause, D., Westphal, S., Wurst, F. M., Luley, C., & Schmidt-Gayk, H. (2005). Detection of recent ethanol intake with new markers: Comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *29*(5), 781–787. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000164372.67018.EA>
- Boumba, V. A. (2022). Modeling Postmortem Ethanol Production/Insights into the Origin of Higher Alcohols. *Molecules*, *27*(3), 700. <https://doi.org/10.3390/molecules27030700>
- Boumba, V. A., Economou, V., Kourkoumelis, N., Gousia, P., Papadopoulou, C., & Vougiouklakis, T. (2012). Microbial ethanol production : Experimental study and multivariate evaluation §. *Forensic Science International*, *215*(1–3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.003>
- Boumba, V. A., Kourkoumelis, N., Gousia, P., Economou, V., Papadopoulou, C., & Vougiouklakis, T. (2013). Modeling microbial ethanol production by *E. coli* under aerobic/anaerobic conditions:

- Applicability to real postmortem cases and to postmortem blood derived microbial cultures. *Forensic Science International*, 232(1–3), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.021>
- Boumba, V. A., Ziavrou, K. S., & Vougiouklakis, T. (2008). Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Science International*, 174(2–3), 133–151. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2007.03.018>
- Boumba, V., Kourkoumelis, N., Ziavrou, K., & Vougiouklakis, T. (2019). Estimating a reliable cutoff point of 1-propanol in postmortem blood as marker of microbial ethanol production. *Journal of Forensic Science and Medicine*, 5(3), 141–146. https://doi.org/10.4103/jfsm.jfsm_8_19
- Briasoulis, A., Agarwal, V., & Messerli, F. H. (2012). Alcohol Consumption and the Risk of Hypertension in Men and Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Journal of Clinical Hypertension* (Vol. 14, Issue 11, pp. 792–798). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/jch.12008>
- Brinkmann, B., Fechner, G., Karger, B., & DuChesne, A. (1998). Ketoacidosis and lactic acidosis - Frequent causes of death in chronic alcoholics? *International Journal of Legal Medicine*, 111(3), 115–119. <https://doi.org/10.1007/s004140050130>
- Bruha, R., Dvorak, K., & Petryl, J. (2012). Alcoholic liver disease. *World Journal of Hepatology*, 4(3), 81–90. <https://doi.org/10.4254/wjh.v4.i3.81>
- Canfield, D. V., Adam, H. J., & Houston, E. R. (1998). Selection of an Internal Standard for Postmortem Ethanol Analysis. *Transportation*. <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA339340>
- Caplan, Y. H., & Goldberger, B. A. (2008). *Blood, Urine, and Other Fluid and Tissue Specimens for Alcohol Analyses*. pp 285-301. <https://trid.trb.org/view/924942>
- Casati, S., Ravelli, A., Angeli, I., Durello, R., Minoli, M., & Orioli, M. (2019). An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *Journal of Chromatography A*, 1589, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.048>
- Ceciliason, A. S., Andersson, M. G., Lundin, E., & Sandler, H. (2021). Microbial neoformation of volatiles: implications for the estimation of post-mortem interval in decomposed human remains in an indoor setting. *International Journal of Legal Medicine*, 135(1), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02436-4>
- Cheymol, G. (2000). Effects of obesity on pharmacokinetics: Implications for drug therapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 39(3), 215–231. <https://doi.org/10.2165/00003088-200039030-00004>

- Chipman, D. M., Duggleby, R. G., & Tittmann, K. (2005). Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 475–481). *Curr Opin Chem Biol*.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.07.002>
- Christopoulos, G., Kirch, E. R., & Gearien, J. E. (1973). Determination of ethanol in fresh and putrefied post mortem tissues. *Journal of Chromatography A*, 87(2), 455–472. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91748-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91748-0)
- Chudley, A. E., Conry, J., Cook, J. L., Looock, C., Rosales, T., & LeBlanc, N. (2005). Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. In *CMAJ* (Vol. 172, Issue 5 SUPPL.). *CMAJ*.
<https://doi.org/10.1503/cmaj.1040302>
- Conner, K. R., Lathrop, S., Caetano, R., Silenzio, V., & Nolte, K. B. (2016). Blood Alcohol Concentrations in Suicide and Motor Vehicle Crash Decedents Ages 18 to 54. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(4), 772–775. <https://doi.org/10.1111/acer.13002>
- Connery, H. S., Albright, B. B., & Rodolico, J. M. (2014). Adolescent substance use and unplanned pregnancy: Strategies for risk reduction. In *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* (Vol. 41, Issue 2, pp. 191–203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2014.02.011>
- Connor, J. P., Haber, P. S., & Hall, W. D. (2016). Alcohol use disorders. In *The Lancet* (Vol. 387, Issue 10022, pp. 988–998). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00122-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00122-1)
- Cooper, G. A. A., Paterson, S., & Osselton, M. D. (2010). The United Kingdom and Ireland Association of Forensic Toxicologists. Forensic toxicology laboratory guidelines (2010). *Science and Justice*, 50(4), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.09.005>
- CORRY, J. E. L. (1978). Possible Sources of Ethanol Ante- and Post-mortem: its Relationship to the Biochemistry and Microbiology of Decomposition. *Journal of Applied Bacteriology*, 44(1), 1–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1978.tb00776.x>
- Da, C., Vieitez, I., Jachmanin, I., De, F., Cardozo, L., & de Oliveir, J. V. (2012). Non-Catalytic Production of Ethyl Esters Using Supercritical Ethanol in Continuous Mode. In *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/52013>
- Davies, M. (2003). The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. In *Journal of Psychiatry and Neuroscience* (Vol. 28, Issue 4, pp. 263–274).
<https://psycnet.apa.org/record/2003-07984-003>
- De Lima, I. V., & Midio, A. F. (1999). Origin of blood ethanol in decomposed bodies. *Forensic Science International*, 106(3), 157–162. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00150-4)

- De Martinis, B. S., Martins Ruzzene, M. A., & Santos Martin, C. C. (2004). Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 522(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.07.007>
- Degutis, L. C., Rabinovici, R., Sabbaj, A., Mascia, R., & D’Onofrio, G. (2004). The Saliva Strip Test Is an Accurate Method to Determine Blood Alcohol Concentration in Trauma Patients. *Academic Emergency Medicine*, 11(8), 885–887. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2004.tb00775.x>
- Dinis-Oliveira, R. J. (2021). The auto-brewery syndrome: A perfect metabolic “storm” with clinical and forensic implications. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm10204637>
- Dougherty, D. M., Charles, N. E., Acheson, A., John, S., Furr, R. M., & Hill-Kapturczak, N. (2012). Comparing the detection of transdermal and breath alcohol concentrations during periods of alcohol consumption ranging from moderate drinking to binge drinking. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 20(5), 373–381. <https://doi.org/10.1037/a0029021>
- Drummer, O. H. (2014). Alcohol: Pharmacology and Disposition. In *Academic Forensic Pathology* (Vol. 4, Issue 2, pp. 128–137). SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA. <https://doi.org/10.23907/2014.022>
- Dubowski, K. M., & Essary, N. A. (1984). Response of breath-alcohol analyzers to acetone: Further studies. *Journal of Analytical Toxicology*, 8(5), 205–208. <https://doi.org/10.1093/jat/8.5.205>
- Duke, A. A., Giancola, P. R., Morris, D. H., Holt, J. C. D., & Gunn, R. L. (2011). Alcohol dose and aggression: Another reason why drinking more is a bad idea. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 72(1), 34–43. <https://doi.org/10.15288/jsad.2011.72.34>
- EDELMAN, I. S., HALEY, H. B., SCHLOERB, P. R., SHELDON, D. B., FRIIS-HANSEN, B. J., STOLL, G., & MOORE, F. D. (1952). Further observations on total body water. I. Normal values throughout the life span. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 95(1), 1–12.
- Ferraguti, G., Ciolli, P., Carito, V., Battagliese, G., Mancinelli, R., Ciafrè, S., Tirassa, P., Ciccarelli, R., Cipriani, A., Messina, M. P., Fiore, M., & Ceccanti, M. (2017). Ethylglucuronide in the urine as a marker of alcohol consumption during pregnancy: Comparison with four alcohol screening questionnaires. *Toxicology Letters*, 275, 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2017.04.016>
- Fisher, R. S., Spitz, D. J., & Spitz, W. U. (2006). Medicolegal investigation of death - guidelines for the application of pathology to crime investigation. In co-edited by D. J. S. ; with a foreword by R. C. edited by Werner U. Spitz (Ed.), *Journal of Forensic Sciences* (4th ed., Vol. 51, Issue 6). Charles C.

Thomas,. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00288.x>

Florou, D., & Boumba, V. A. (2021). Hair analysis for New Psychoactive Substances (NPS): Still far from becoming the tool to study NPS spread in the community? *Toxicology Reports*, 8, 1699–1720. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.09.003>

Gable, R. S. (2004). Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. In *Addiction* (Vol. 99, Issue 6, pp. 686–696). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2004.00744.x>

Gallagher, C., McCarthy, F. P., Ryan, R. M., & Khashan, A. S. (2018). Maternal Alcohol Consumption During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Retrospective Analysis of the Millennium Cohort Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48(11), 3773–3782. <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3626-6>

Gamella, M., Campuzano, S., Manso, J., Rivera, G. G. de, López-Colino, F., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2014). A novel non-invasive electrochemical biosensing device for in situ determination of the alcohol content in blood by monitoring ethanol in sweat. *Analytica Chimica Acta*, 806, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.020>

Gao, B., & Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. In *Gastroenterology* (Vol. 141, Issue 5, pp. 1572–1585). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002>

Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, 44(1), 106–139. <https://doi.org/10.1128/mr.44.1.106-139.1980>

Giancola, P. R., Josephs, R. A., Parrott, D. J., & Duke, A. A. (2010). Alcohol myopia revisited: Clarifying aggression and other acts of disinhibition through a distorted lens. In *Perspectives on Psychological Science* (Vol. 5, Issue 3, pp. 265–278). SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA. <https://doi.org/10.1177/1745691610369467>

Gilliland, M. G. F., & Bost, R. O. (1993). Alcohol in Decomposed Bodies: Postmortem Synthesis and Distribution. *Journal of Forensic Sciences*, 38(6), 13533J. <https://doi.org/10.1520/jfs13533j>

Gnann, H., Weinmann, W., & Thierauf, A. (2012). Formation of Phosphatidylethanol and Its Subsequent Elimination During an Extensive Drinking Experiment Over 5 Days. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(9), 1507–1511. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01768.x>

Gonzalez, R., & Morales, P. (2017). Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1449–1450. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12770>

- Greene, N., Esser, M. B., Vesselinov, R., Auman, K. M., Kerns, T. J., & Lauerman, M. H. (2020). Variability in antemortem and postmortem blood alcohol concentration levels among fatally injured adults. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. <https://doi.org/10.1080/00952990.2020.1822856>
- Gubala, W. (1990). n-Butanol in blood as the indicator of how long a dead body lay in water. *Forensic Science International*, 46(1–2), 127–128. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90149-S](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90149-S)
- Hammer, J. H., Parent, M. C., & Spiker, D. A. (2018). Global status report on alcohol and health. In *Global status report on alcohol* (Vol. 65, Issue 1). http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29355346
- Hannuksela, M. L., Liisanantti, M. K., Nissinen, A. E. T., & Savolainen, M. J. (2007). Biochemical markers of alcoholism. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Vol. 45, Issue 8, pp. 953–961). Clin Chem Lab Med. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.190>
- Hanzlick, R. (2009). Ethanol concentration in decomposing bodies: Another look, less concern. In *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 88–89). Am J Forensic Med Pathol. <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e3181873814>
- Hanzlick, R. L. (2014). Postmortem Ethanol Concentrations and Postmortem Ethanol Production. *Academic Forensic Pathology*, 4(2), 156–160. <https://doi.org/10.23907/2014.025>
- Hawthorne, J. S., & Wojcik, M. H. (2006). Transdermal alcohol measurement: A review of the literature. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 39(2), 65–71. <https://doi.org/10.1080/00085030.2006.10757138>
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Hegstad, S., Kristoffersen, L., Liane, V. H., & Spigset, O. (2017). EtG and EtS in autopsy blood samples with and without putrefaction using UPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(2), 107–113. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw123>
- Helander, A., & Beck, O. (2004). Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. *Clinical Chemistry*, 50(5), 936–937. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031252>
- Helander, A., Beck, O., & Jones, A. W. (1995). Distinguishing Ingested Ethanol from Microbial Formation by Analysis of Urinary 5-Hydroxytryptophol and 5-Hydroxyindoleacetic Acid. *Journal of Forensic*

Sciences, 40(1), 13768J. <https://doi.org/10.1520/jfs13768j>

- Henriksen, T. B., Hjollund, N. H., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Andersson, A. M., Kolstad, H., Ernst, E., Giwercman, A., Skakkebæk, N. E., & Olsen, J. (2004). Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology*, 160(7), 661–667. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh259>
- Hodgson, B. T. (2008). The validity of evidential breath alcohol testing. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 41(2), 83–96. <https://doi.org/10.1080/00085030.2008.10757167>
- Honey, D., Caylor, C., Luthi, R., & Kerrigan, S. (2005). Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(5), 365–369. <https://doi.org/10.1093/jat/29.5.365>
- Intelmann, D., Haseleu, G., & Hofmann, T. (2009). LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1172–1182. <https://doi.org/10.1021/jf803040g>
- Jaffré, J., & Sboui, A. (2010). Henry' law and gas phase disappearance. *Transport in Porous Media*, 82(3), 521–526. <https://doi.org/10.1007/s11242-009-9407-0>
- Janssen, P. H. (2004). Propanol as an end product of threonine fermentation. *Archives of Microbiology*, 182(6), 482–486. <https://doi.org/10.1007/S00203-004-0732-Y>
- JANT_Pharmacal_Corporation. (n.d.). Accustrip Saliva Alcohol Test.
- Jones, A. W. (1979). Distribution of ethanol between saliva and blood in man. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 6(1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1979.tb00007.x>
- Jones, A. W. (1993). Disappearance Rate of Ethanol from the Blood of Human Subjects: Implications in Forensic Toxicology. *Journal of Forensic Sciences*, 38(1), 13382J. <https://doi.org/10.1520/jfs13382j>
- Jones, A. W. (1995). Measuring ethanol in saliva with the qed® enzymatic test device: comparison of results with blood- and breath-alcohol concentrations. In *Journal of Analytical Toxicology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 169–174). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jat/19.3.169>
- Jones, A. W. (1997). Driving under the influence of acetone. *Clinical Toxicology*, 35(4), 419–421. <https://doi.org/10.3109/15563659709043378>
- Jones, A. W. (2000). Ethanol metabolism in patients with liver cirrhosis. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 7(1), 48–51. <https://doi.org/10.1054/JCFM.2000.0363>

- Jones, A. W. (2003). Disposition and fate of drugs in the body. In *Medical-legal aspects of alcohol* (Vol. 6, Issue 5, pp. 47–112). Lawyers and Judges Publishing. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027261170/>
- Jones, A. W. (2015). Alcohol: Acute and Chronic Use and Postmortem Findings. In *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine: Second Edition* (Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00013-6>
- Jones, A. W., Eklund, A., & Helander, A. (2000). Misleading results of ethanol analysis in urine specimens from rape victims suffering from diabetes. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 7(3), 144–146. <https://doi.org/10.1054/jcfm.2000.0432>
- Jones, A. W., & Holmgren, P. (2001). Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *Journal of Clinical Pathology*, 54(9), 699–702. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.9.699>
- Jones, A. W., & Holmgren, P. (2003). Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *Forensic Science International*, 135(3), 206–212. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00213-5)
- Jones, A W, & Pounder, D. J. (1998). Measuring blood-alcohol concentration for clinical and forensic purposes. In *Drug abuse handbook* (Issue 5.2, pp. 327–356). <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=MFbm2SRUUNsC&oi=fnd&pg=PA327&dq=Jones+A+W,+Pounder+D.+Measuring+blood+alcohol+concentration+for+clinical+and+forensic+purposes.+In:+Krach+S,+editor.+Drug+Abuse+Handbook.+San+Fancisco:+CRC+Press+LLC,+1997:+327-355>
- Jones, Alan W. (2019). Alcohol, its analysis in blood and breath for forensic purposes, impairment effects, and acute toxicity. *WIREs Forensic Science*, 1(6), 1–32. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1353>
- Jones, Alan Wayne. (2008). Ultra-rapid rate of ethanol elimination from blood in drunken drivers with extremely high blood-alcohol concentrations. *International Journal of Legal Medicine*, 122(2), 129–134. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0181-7>
- Jones, Alan Wayne. (2010). Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. In *Forensic Science International* (Vol. 200, Issues 1–3, pp. 1–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.02.021>
- Jones, Alan Wayne, & Cowan, J. M. (2020). Reflections on variability in the blood–breath ratio of ethanol and its importance when evidential breath-alcohol instruments are used in law enforcement. *Forensic Sciences Research*, 5(4), 300–308. <https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1780720>
- Jung, A., Jung, H., Auwärter, V., Pollak, S., Fárr, A. M., Hecser, L., & Schiopu, A. (2010). Volatile congeners in alcoholic beverages: Analysis and forensic significance. *Romanian Journal of Legal*

Medicine, 18(4), 265–270. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2010.265>

- Kaji, H., Asanuma, Y., Yahara, O., Shibue, H., Hisamura, M., Saito, N., Kawakami, Y., & Murao, M. (1984). Intra-gastrointestinal Alcohol Fermentation Syndrome: Report of Two Cases and Review of the Literature. In *Journal of the Forensic Science Society* (Vol. 24, Issue 5, pp. 461–471). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(84\)72325-5](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(84)72325-5)
- Kalapos, M. P. (2003). On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621(2), 122–139. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00051-5)
- Kalichman, S. C., Simbayi, L. C., Kaufman, M., Cain, D., & Jooste, S. (2007). Alcohol use and sexual risks for HIV/AIDS in sub-saharan Africa: Systematic review of empirical findings. In *Prevention Science* (Vol. 8, Issue 2, pp. 141–151). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11121-006-0061-2>
- Kelly, A. T., & Mozayani, A. (2012). An overview of alcohol testing and interpretation in the 21st century. In *Journal of Pharmacy Practice* (Vol. 25, Issue 1, pp. 30–36). J Pharm Pract. <https://doi.org/10.1177/0897190011431149>
- Kinoshita, H., Ijiri, I., Ameno, S., Tanaka, N., Kubota, T., Tsujinaka, M., Watanabe, R., & Ameno, K. (1998). Combined toxicity of methanol and formic acid: Two cases of methanol poisoning. *International Journal of Legal Medicine*, 111(6), 334–335. <https://doi.org/10.1007/s004140050183>
- Klatsky, A. L. (2015). Alcohol and cardiovascular diseases: Where do we stand today? In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 278, Issue 3, pp. 238–250). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/joim.12390>
- Kruckenber, K. M., DiMartini, A. F., Rymer, J. A., Pasculle, A. W., & Tamama, K. (2020). Urinary auto-brewery syndrome: A case report. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 172, Issue 10, pp. 702–704). American College of Physicians. <https://doi.org/10.7326/L19-0661>
- Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2007). Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International*, 165(1), 10–29. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.004>
- Kuhlman, J. J., Levine, B., Smith, M. L., & Hordinsky, J. R. (1991). Toxicological Findings in Federal Aviation Administration General Aviation Accidents. *Journal of Forensic Sciences*, 36(4), 13127J. <https://doi.org/10.1520/jfs13127j>
- Kuhns, J. B., Exum, M. L., Clodfelter, T. A., & Bottia, M. C. (2014). The Prevalence of Alcohol-Involved Homicide Offending: A Meta-Analytic Review. *Homicide Studies*, 18(3), 251–270. <https://doi.org/10.1177/1088767913493629>

- Kummer, N., Lambert, W. E. E., Samyn, N., & Stove, C. P. (2016). Alternative sampling strategies for the assessment of alcohol intake of living persons. *Clinical Biochemistry*, *49*(13–14), 1078–1091. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.007>
- Lambert, I. H., Kristensen, D. M., Holm, J. B., & Mortensen, O. H. (2015). Physiological role of taurine – from organism to organelle. In *Acta Physiologica* (Vol. 213, Issue 1, pp. 191–212). Acta Physiol (Oxf). <https://doi.org/10.1111/apha.12365>
- Lands, W. E. M. (1998). A review of alcohol clearance in humans. In *Alcohol* (Vol. 15, Issue 2, pp. 147–160). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(97\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(97)00110-9)
- Levine, B., Isenschmid, D. S., & Smith, M. L. (2013). Principles of forensic toxicology. In B. Levine (Ed.), *Principles of Forensic Toxicology* (Fourth edi). AACC Press.
- Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K., & Vu, N. T. (2004a). Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Science International*, *146*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.015>
- Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K., & Vu, N. T. (2004b). Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Science International*, *146*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.015>
- Lieber, C. S. (1999). Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998)—A Review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *23*(6), 991–1007. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.1999.TB04217.X>
- Linares, P., Ruz, J., De Castro, M. D. L., & Valcarcel, M. (1987). Enzymatic determination of ethanol in saliva by flow injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *5*(7), 701–706. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(87\)80083-3](https://doi.org/10.1016/0731-7085(87)80083-3)
- Liu, Y., Zhang, X., Li, J., Huang, Z., Lin, Z., Wang, J., Zhang, C., & Rao, Y. (2018). Stability of ethyl glucuronide, ethyl sulfate, phosphatidylethanol and fatty acid ethyl esters in postmortem human blood. *Journal of Analytical Toxicology*, *42*(5), 346–352. <https://doi.org/10.1093/jat/bky010>
- Lo, J., Zheng, T., Hon, S., Olson, D. G., & Lynd, L. R. (2015). The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, adhE, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Journal of Bacteriology*, *197*(8), 1386–1393. <https://doi.org/10.1128/JB.02450-14>
- Logan, B. K., & Jones, A. W. (2000). Endogenous ethanol “auto-brewery syndrome” as a drunk-driving defence challenge. *Medicine, Science and the Law*, *40*(3), 206–215.

<https://doi.org/10.1177/002580240004000304>

Logan, Barry K., Gullberg, R. G., & Elenbaas, J. K. (1994). Isopropanol Interference with Breath Alcohol Analysis: A Case Report. *Journal of Forensic Sciences*, 39(4), 1369-1371.

<https://doi.org/10.1520/jfs13691j>

Lundsberg, L. S., Peglow, S., Qasba, N., Yonkers, K. A., & Garipey, A. M. (2018). Is Preconception Substance Use Associated With Unplanned or Poorly Timed Pregnancy? *Journal of Addiction Medicine*, 12(4), 321–328. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000409>

Mackus, M., van de Loo, A. J. A. E., Garssen, J., Kraneveld, A. D., Scholey, A., & Verster, J. C. (2020). The role of alcohol metabolism in the pathology of alcohol hangover. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1–14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

<https://doi.org/10.3390/jcm9113421>

Mason, M. F., & Dubowski, K. M. (1974). Alcohol, traffic, and chemical testing in the United States: a résumé and some remaining problems. In *Clinical chemistry* (Vol. 20, Issue 2, pp. 126–140). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.2.126>

Mass Spectrometry Database Committee. (2007). *American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section*, 2007–2007. <https://sites.ualberta.ca/~gjones/mslib.htm>

Miyazaki, T., Ishikura, K., Honda, A., Ra, S. G., Komine, S., Miyamoto, Y., Ohmori, H., & Matsuzaki, Y. (2015). Increased N-Acetyltaurine in serum and urine after endurance exercise in human. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 803, 53–62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15126-7_5

Moriya, F., & Hashimoto, Y. (2004). Postmortem production of ethanol and n-propanol in the brain of drowned persons. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 25(2), 131–133.

<https://doi.org/10.1097/01.paf.0000127402.97576.42>

Moriya, F., Hashimoto, Y., Furumiya, J., & Nishioka, S. (2005). Effects of perimortem physical factors associated with death on exogenous ethanol concentrations in cardiac blood. *Legal Medicine*, 7(4), 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.03.003>

Moskowitz, H., & Lawyers & Judges Publishing Company, I. (2008). *Analysis for Alcohol in Postmortem Specimens*. pp 285-301. <https://trid.trb.org/view/924942>

Norberg, Å., Sandhagen, B., Bratteby, L. E., Gabrielsson, J., Jones, A. W., Fan, H., & Hahn, R. G. (2001). Do ethanol and deuterium oxide distribute into the same water space in healthy volunteers? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(10), 1423–1430. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02143.x>

- O'Neal, C. L., & Poklis, A. (1996). Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A critical review. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 17(1), 8–20. <https://doi.org/10.1097/00000433-199603000-00002>
- O'Neal, C. L., Wolf, C. E., Levine, B., Kunsman, G., & Poklis, A. (1996). Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Science International*, 83(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(96\)02007-5](https://doi.org/10.1016/0379-0738(96)02007-5)
- Obeidat, Y. (2021). The Most Common Methods for Breath Acetone Concentration Detection: A Review. *IEEE Sensors Journal*, 21(13), 14540–14558. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2021.3074610>
- Östman, M. (2018). *Antimicrobials in sewage treatment plants* (Issue October). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30958.87367>
- Paine, A. J. (2001). Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human and Experimental Toxicology*, 20(11), 563–568. <https://doi.org/10.1191/096032701718620864>
- Patra, J., Taylor, B., Irving, H., Roerecke, M., Baliunas, D., Mohapatra, S., & Rehm, J. (2010). Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types - A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-258/FIGURES/7>
- Payne, J. P., Hill, D. W., & Wood, D. G. L. (1968). Distribution of ethanol between plasma and erythrocytes in whole blood. In *Nature* (Vol. 217, Issue 5132, pp. 963–964). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/217963a0>
- Peterson, L. I. (2013). Chemistry of alcoholic beverages. In *Alcohol* (pp. 49–56). <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199655786.003.0007>
- Pinckard, J. K. (2001a). Principles of Forensic Toxicology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125(4), 581–581. <https://doi.org/10.5858/2001-125-581b-poft>
- Pinckard, J. K. (2001b). Principles of Forensic Toxicology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125(4), 581–581. <https://doi.org/10.5858/2001-125-581b-poft>
- Pironi, L. (2016). Definitions of intestinal failure and the short bowel syndrome. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 30, Issue 2, pp. 173–185). Baillière Tindall. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.011>
- Politi, L., Leone, F., Morini, L., & Polettini, A. (2007). Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Analytical*

Biochemistry, 368(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.05.003>

- Rahman, M. R., Allan, J. T. S., Zamanzad Ghavidel, M., Prest, L. E., Saleh, F. S., & Easton, E. B. (2016). The application of power-generating fuel cell electrode materials and monitoring methods to breath alcohol sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 228, 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.061>
- Rehm, J., Shield, K. D., Joharchi, N., & Shuper, P. A. (2012). Alcohol consumption and the intention to engage in unprotected sex: Systematic review and meta-analysis of experimental studies. In *Addiction* (Vol. 107, Issue 1, pp. 51–59). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03621.x>
- Roberts, C., & Robinson, S. P. (2007). Alcohol concentration and carbonation of drinks: The effect on blood alcohol levels. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 14(7), 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2006.12.010>
- Rodda, L. N., Beyer, J., Gerostamoulos, D., & Drummer, O. H. (2013). Alcohol congener analysis and the source of alcohol: A review. In *Forensic Science, Medicine, and Pathology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 194–207). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12024-013-9411-0>
- Rossow, I. (2001). Alcohol and homicide: a cross-cultural comparison of the relationship in 14 European countries. *Addiction*, 96(1s1), 77–92. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.96.1s1.7.x>
- Saier, M. H. (1996). Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 138, Issues 2–3, pp. 97–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08141.x>
- Saitman, A., Estrada, J., Fitzgerald, R. L., & McIntyre, I. M. (2015). Comparative analysis of hospital and forensic laboratory ethanol concentrations: A 15 month investigation of antemortem specimens. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 33, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.03.012>
- Santunione, A. L., Verri, P., Marchesi, F., Rustichelli, C., Palazzoli, F., Vandelli, D., Licata, M., & Silingardi, E. (2018). The role of ethyl glucuronide in supporting medico-legal investigations: Analysis of this biomarker in different postmortem specimens from 21 selected autopsy cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 53, 25–30. <https://doi.org/10.1016/J.JFLM.2017.10.009>
- Schoeps, A., Peterson, E. R., Mia, Y., Waldie, K. E., Underwood, L., D'Souza, S., & Morton, S. M. B. (2018). Prenatal alcohol consumption and infant and child behavior: Evidence from the Growing Up in New Zealand Cohort. *Early Human Development*, 123, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.EARLHUMDEV.2018.06.011>

- Schulz, K., Klaus Mueller, R., Engewald, W., Graefe, A., & Dreßler, J. (2007). Determination of aroma compounds from alcoholic beverages in spiked blood samples by means of dynamic headspace GC-MS. *Chromatographia*, 66(11–12), 879–886. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0414-4>
- Schulz, K., Schlenz, K., Metasch, R., Malt, S., Römhild, W., & Dreßler, J. (2008). Determination of anethole in serum samples by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for congener analysis. *Journal of Chromatography A*, 1200(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.066>
- Scott-Sheldon, L. A. J., Carey, K. B., Cunningham, K., Johnson, B. T., & Carey, M. P. (2016). Alcohol Use Predicts Sexual Decision-Making: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Experimental Literature. *AIDS and Behavior*, 20(0 1), 19–39. <https://doi.org/10.1007/s10461-015-1108-9>
- Siqueira, P., Bolini, H., & Macedo, G. (2011). Polyphenols and antioxidant properties in forced and naturally aged Brazilian beer. *J Brew Distill*, 2(May), 45–50. <https://doi.org/10.5897/JBD.9000005>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (6η). Ευριδίκη Κωσταράκη.
- Song, B. J., Akbar, M., Jo, I., Hardwick, J. P., & Abdelmegeed, M. A. (2015). Translational Implications of the Alcohol-Metabolizing Enzymes, Including Cytochrome P450-2E1, in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 74, pp. 303–372). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.04.002>
- Sonmez, M. B., Cinar, R. K., Gorgulu, Y., Kilic, E. K., & Unal, A. (2017). Evaluation of phosphatidylethanol by ELISA for detection of excessive alcohol use compared with traditional biomarkers: A case-control study. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 27(1), 41–46. <https://doi.org/10.1080/24750573.2017.1293249>
- Standard Reference Data | NIST*. (2017). NIST. <https://www.nist.gov/srd>
- Stornetta, A., Guidolin, V., & Balbo, S. (2018). Alcohol-derived acetaldehyde exposure in the oral cavity. In *Cancers* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010020>
- Swings, J., & De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. In *Bacteriological Reviews* (Vol. 41, Issue 1, pp. 1–46). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/mmbr.41.1.1-46.1977>
- Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/S002530000486>
- Ueno, Y., Adachi, J., Imamichi, H., Nishimura, A., & Tatsuno, Y. (1996). Effect of the Cytochrome P-1450IIE1 Genotype on Ethanol Elimination Rate in Alcoholics and Control Subjects. *Alcoholism:*

Clinical and Experimental Research, 20(s1), 17a-21a. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01720.x>

Vaillant, G. E., & Keller, M. (n.d.). *Alcohol consumption - Alcohol and society* | *Britannica*. Retrieved January 16, 2022, from <https://www.britannica.com/topic/alcohol-consumption/Alcohol-and-society>

Velivasi, G., Kourkoumelis, N., Sakkas, H., & Boumba, V. A. (2021). Modeling microbial ethanol production by *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis* under aerobic/anaerobic conditions — applicability to laboratory cultures and real postmortem cases. *International Journal of Legal Medicine*, 135(6), 2555–2565. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02638-4>

Velivasi, G., Sakkas, H., Kourkoumelis, N., & Boumba, V. A. (2021a). Modeling postmortem ethanol production by *C. albicans*: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International*, 324, 110809. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110809>

Velivasi, G., Sakkas, I., Kourkoumelis, N., & Boumba, V. A. (2021b). Modeling postmortem ethanol production by *C. albicans*: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International*, 324. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110809>

Vogeser, M., & Kirchhoff, F. (2011). Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 44, Issue 1, pp. 4–13). Clin Biochem. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.005>

Vogeser, M., & Seger, C. (2008). A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 41, Issue 9, pp. 649–662). Clin Biochem. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017>

Watterson, J. H. (2009). Assessment of response of the intoxilyzer® 8000c to volatiles of forensic relevance in vitro, part I: Acetone, isopropanol, and methanol. *Journal of Analytical Toxicology*, 33(2), 109–117. <https://doi.org/10.1093/jat/33.2.109>

Wigmore, J. G., & Chow, B. L. C. (2000). Case report: Detection of neo-formation of ethanol in a postmortem blood sample using N-propanol and a urine sample. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 33(3), 145–149. <https://doi.org/10.1080/00085030.2000.10757510>

Wiley Science Solutions. (2019). *Wiley Science Solutions*. <https://sciencesolutions.wiley.com/>

Willaert, R., & Nedovic, V. (2006). Primary beer fermentation by immobilised yeast - A review on flavour formation and control strategies. In *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Vol. 81, Issue 8, pp. 1353–1367). <https://doi.org/10.1002/jctb.1582>

- Winek, C. L., & Esposito, F. M. (1981). Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Science International*, *17*(1), 27–36.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(81\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0379-0738(81)90185-7)
- Winek, C. L., Henry, D., & Kirkpatrick, L. (1983). The influence of physical properties and lipid content of bile on the human blood/bile ethanol ratio. *Forensic Science International*, *22*(2–3), 171–178.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(83\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0379-0738(83)90010-5)
- Winek, C. L., Wahba, W. W., Winek, C. L., & Balzer, T. W. (2001). Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Science International*, *122*(2–3), 107–123. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00483-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00483-2)
- Wolfe, A. J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *69*(1), 12–50.
<https://doi.org/10.1128/membr.69.1.12-50.2005>
- Wolfe, R. S., & Wiegel, J. (1980). Formation of ethanol by bacteria. A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experientia* *1980* *36*:12, *36*(12), 1434–1446. <https://doi.org/10.1007/BF01960144>
- Wood, H. G. (1981). Metabolic Cycles in the Fermentation by Propionic Acid Bacteria. In *Current Topics in Cellular Regulation* (Vol. 18, Issue C, pp. 255–287). Curr Top Cell Regul.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152818-8.50021-9>
- Woolf-King, S. E., & Maisto, S. A. (2011). Alcohol use and high-risk sexual behavior in sub-saharan Africa: A narrative review. *Archives of Sexual Behavior*, *40*(1), 17–42. <https://doi.org/10.1007/s10508-009-9516-4>
- Wu, A. H. B., Kelly, T., McKay, C., Ostheimer, D., Forte, E., & Hill, D. (1995). Definitive Identification of an Exceptionally High Methanol Concentration in an Intoxication of a Surviving Infant: Methanol Metabolism by First-Order Elimination Kinetics. *Journal of Forensic Sciences*, *40*(2), 15366J.
<https://doi.org/10.1520/jfs15366j>
- Wurst, F. M., Skipper, G. E., & Weinmann, W. (2003). Ethyl glucuronide - The direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. In *Addiction* (Vol. 98, Issue SUPPL. 2, pp. 51–61). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.1359-6357.2003.00588.x>
- Wyman, C. E., & Hinman, N. D. (1990). Ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* *1990* *24*:1, *24*(1), 735–753. <https://doi.org/10.1007/BF02920291>
- Yilmaztekin, M., & Cabaroglu, T. (2011). Confirmatory method for the determination of volatile congeners and methanol in Turkish raki according to European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: Single-

laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 94(2), 611–617.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/94.2.611>

Yost, G. (2013). Evidential Breath Testing for Alcohol: Parliament, the Science and the Courts. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 46(1), 59–78.
<https://doi.org/10.1080/00085030.2013.10757197>

Ziavrou, K., Boumba, V. A., & Vougiouklakis, T. G. (2005). Insights into the origin of postmortem ethanol. In *International Journal of Toxicology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 69–77).
<https://doi.org/10.1080/10915810590936391>

Zuba, D. (2008). Accuracy and reliability of breath alcohol testing by handheld electrochemical analysers. *Forensic Science International*, 178(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.03.002>

Μιχαλοδημητράκης, Μ. (2001). *Ιατροδικαστική Διερεύνηση του Θανάτου* (2η). ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.