

## STRESZCZENIE

### Wstęp:

Sądowo- lekarska sekcja zwłok ma na celu ustalenie przyczyny zgonu i jak najdokładniejsze odtworzenie okoliczności śmierci, co ma istotne znaczenie dla organów ścigania, firm ubezpieczeniowych i epidemiologii. W praktyce poza zdarzeniami kryminalnymi duża część sądowo-lekarskich sekcji zwłok to początek szczegółowej diagnostyki pośmiertnej zgonów o podłożu chorobowym, w tym nagłych zgonów sercowych (ang. sudden cardiac death, SCD). Czynnościowy patomechanizm zgonu SCD sprawia trudności w opiniowaniu sądowo-lekarskim ze względu na możliwy brak uchwytnych w badaniu makro- i mikroskopowym zmian morfologicznych. Wynik badania sekcyjnego (tzw. „sekcja biała”) nie pozwalała wówczas na pewne opiniowanie o przyczynie zgonu. Pomocne w pośmiertnej diagnostyce nagłych zgonów sercowych mogą okazać się wczesne markery uszkodzenia mięśnia sercowego, które rutynowo wykorzystywane są do diagnostyki przyżyciowej martwicy mięśnia sercowego. Są nimi: odznaczające się wysoką kardiospecyficznością - m.in.: sercowa izoforma troponiny I (cTnI), typ sercowy białka wiążącego kwasy tłuszczowe (H-FABP), izoenzym MB kinazy kreatynowej (CK-MB) a także kopeptyna. Pojawiają się we krwi zdecydowanie szybciej niż zmiany martwicze możliwe do wykrycia makro- lub mikroskopowego.

### Cel pracy:

Oznaczenie stężenia markerów martwicy mięśnia sercowego (izoenzym MB kinazy kreatynowej (CK-MB<sub>mass</sub>),sercowej troponiny I (cTnI), ludzkiej kopeptyny (HCPP), ludzkiego białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu sercowego (h-FABP) we krwi, płynie z gałki ocznej i płynie osierdziowym pobranych i zabezpieczonych podczas sekcji sądowo-lekarskich. Określenie wartości diagnostycznej stężenia poszczególnych markerów martwicy mięśnia sercowego dla rozpoznania sekcyjnego w przypadku podejrzenia nagłego zgonu sercowego, a także zależności pomiędzy stężeniem markerów martwicy mięśnia sercowego a czasem od zgonu do pobrania materiału. Zbadanie korelacji pomiędzy stężeniami oznaczanych markerów w poszczególnych badanych materiałach.

## Materiał i metody:

Do badania został wykorzystany materiał biologiczny będący niewykorzystaną pozostałością po badaniach zleczanych przez prokuratora prowadzącego sekcję sądowo-lekarską w celach procesowych na mocy przepisów kodeksu postępowania karnego.

Kryterium włączenia do badań materiału biologicznego była dokumentacja dotycząca okoliczności zgonu oraz wstępne wyniki sekcji zwłok. Do badań wykorzystano krew pełną, płyn z gałki ocznej oraz płyn osierdziowy. Grupę badaną stanowiło 54 przypadków, a grupę kontrolną 50 przypadków. Z zabezpieczonego materiału wykonano oznaczenia wczesnych markerów uszkodzenia mięśnia sercowego (wysokoczuła troponina I, CK-MB, ludzka kopeptyna (HCCP), h-FABP wykorzystując do analizy technikę immunoenzymofluorescencyjną (ELFA-enzyme linked fluorescent assay) oraz ELISA.

## Wyniki:

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badaną oraz kontrolną w zakresie analizowanych markerów kardiologicznych (wysokoczuła troponina I, CK-MB, kopeptyna, h-FABP).

Wykazano istotnie statystyczną różnicę stężenia h-FABP pomiędzy poszczególnymi materiałami badanymi (płyn osierdziowy > surowica > ciało szkliste oka) zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej.

Zaobserwowano, że w grupie kontrolnej im osoba starsza, tym wyższy wynik stężenia H-CCP i H-FABP w płynie gałki ocznej, a także im dłuższy czas od zgonu do pobrania materiału, tym wyższa wartość stężenia CK-MB w płynie gałki ocznej. W grupie badanej wykazano, że im dłuższy czas od zgonu do pobrania materiału, tym niższa wartość stężenia HCCP w płynie worka osierdziowego.

Osoby z grupy kontrolnej, które były resuscytowane, uzyskały istotnie statystycznie wyższą średnią stężenia HCCP w płynie osierdziowym w porównaniu do nieresuscytowanych osób z tej grupy.

Osoby z grupy kontrolnej, u których występowały zmiany makroskopowe układu sercowo-naczyniowego, uzyskały istotnie statystycznie wyższą średnią HCCP w ciałku szklistym gałki ocznej w odniesieniu do osób bez tego typu zmian.

W grupie kontrolnej zaobserwowano, że im wyższe stężenie HCCP w ciałku szklistym oka, tym wyższe stężenie także CK-MBmass w tym samym materiale. W grupie badanej natomiast zaobserwowano, że im wyższe stężenie HCCP w surowicy tym wyższe stężenie H-FABP w tym samym materiale biologicznym.

Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami wyliczając stosunek (tzw. RATIO) pomiędzy H-FABP i HCCP w różnych materiałach biologicznych.

Stężenie CK-MB w płynie z gałki szklistej oka oznaczane tuż po zgonie jest wyższe u pacjentów z obecnymi w trakcie sekcji zwłok zmianami makroskopowymi układu sercowo-naczyniowego. Stężenie CK-MB w tej grupie jest tym wyższe, im więcej czasu mija od zgonu do zabezpieczenia materiału do badań laboratoryjnych. Jednak dynamika wzrostu stężenia CK-MB w zależności od PMI (ang. postmortem interval, czasu od zgonu) jest zdecydowanie wyższa u pacjentów bez zmian makroskopowych uwidocznionych w trakcie sekcji zwłok.

Stężenie CK-MBmass w ciałku szklistym gałki ocznej po 2 dniach od zgonu rośnie dość dynamicznie u zmarłych w przypadku niezaobserwowania zmian makroskopowych, w porównaniu do tych z widocznymi zmianami.

Obecność wykładników morfologicznych przewlekłego niedokrwienia i niedotlenienia mięśnia sercowego w obrazie histopatologicznym powoduje 36-krotny wzrost prawdopodobieństwa uznania nagłego zgonu sercowego jako ostateczną przyczynę zgonu w opiniowaniu sądowo-lekarskim.

Zmiany makroskopowe opisane w trakcie sądowo-lekarskiej sekcji zwłok uwidoczniło częściej w grupie badanej niż w grupie kontrolnej w stosunku prawie 8 do 1. Z wiekiem denatów rośnie prawdopodobieństwo przynależności zmarłego do grupy badawczej, a różnica np. 10 lat generuje wzrost ryzyka o ok. 35%.

Wnioski:

1. Sprawdzone i zwalidowane we krwi pobranej przyżyciowo metody oznaczania troponiny I i CK-MBmass przy zastosowaniu techniki ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) nie znajdują zastosowania w przypadku diagnostyki tanatochemicznej.

2. Oznaczanie markerów kardiologicznych zarówno we krwi jak i innych, alternatywnych materiałach biologicznych zabezpieczonych w trakcie sekcji sądowo- lekarskiej, wydaje się być, na dzisiejsze możliwości analityczne i na dzisiejszą wiedzę z zakresu tanatodiagnostyki, nieprzydatne w przypadkach gdy sekcja zwłok dokonywana jest w realiach polskich Zakładów Medycyny Sądowej po średnio 5-6 dniach od zgonu.

3. W aktualnej sytuacji organizacyjno- prawnej polskich Zakładów Medycyny Sądowej wprowadzenie do rutynowego wykorzystania diagnostyki tanatochemicznej wydaje się być wyjątkowo ograniczone do pojedynczych przypadków spełniających kryteria PMI poniżej 48 godzin, a co za tym idzie może okazać się nieopłacalne do rutynowego wykorzystania.

4. Z uzyskanych danych wynika, że dynamika wzrostu stężenia CK-MB w płynie z gałki oka zależna od PMI jest zdecydowanie wyższa u pacjentów grupy kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. Konieczna wydaje się szczegółowa analiza dynamiki zmian stężenia poszczególnych markerów kardiologicznych w różnych materiałach biologicznych w celu wyeliminowania uzyskania wyników fałszywie zawyżonych i możliwej błędnej interpretacji ostatecznej przyczyny zgonu.

5. Zarówno we krwi jak i pozostałych materiałach badanych wykazano obecność ludzkiej kopeptyny i h-FABP. Wykorzystanie tych alternatywnym markerów uszkodzenia mięśnia sercowego oraz pogłębienie badań z tego zakresu może wspomóc w dalszym rozwoju laboratoryjnej tanatodiagnostyki nagłych zgonów sercowych.

## SUMMARY

### Introduction

A forensic post-mortem examination aims to establish the cause of death and to reproduce the circumstances of death as accurately as possible. It is important for law enforcement agencies, insurance companies and epidemiology. In practice, apart from criminal incidents, many forensic post-mortem examinations are the beginning of a detailed post-mortem diagnosis of disease-related deaths, including sudden cardiac deaths (SCD). The functional pathomechanism of SCD makes difficult to provide a forensic medical opinion due to the lack of morphological changes in macro- and microscopic examination. The result of the autopsy does not allow to establish the cause of death and often the diagnosis is made by exclusion. Early markers of myocardial damage, which are routinely used in the clinical diagnosis of myocardial necrosis, may be helpful in the post-mortem diagnosis of sudden cardiac deaths. These are characterized by high cardiospecificity: cardiac troponin I (cTnI), cardiac fatty acid binding protein (H-FABP), creatine kinase myocardial band isoenzyme (CK-MB) and copeptin. These markers appear in the blood much faster than necrotic changes that can be detected macro- or microscopically.

### The aim of the study

The aim of this doctoral dissertation was to determine concentrations of selected early markers of myocardial damage (isoenzyme MB creatine kinase (CK-MBmass), cardiac troponin I (cTnI), human copeptin (H-CCP), human cardiac fatty acid binding protein (h-FABP) in the blood, vitreous humor and pericardial fluid obtained during forensic autopsy. The research was conducted in both study and control groups, in order to reveal possible difference between the two groups. Therefore it could provide the evidences for the diagnostic value of the cardiac markers concentration for autopsy diagnosis in case of suspected sudden cardiac death, as well as identify possible inter-correlations between the concentration of myocardial necrosis markers and the post- mortem interval. An additional aim of this work was to examine the diagnostic application of cardiac markers ratio in tested materials.

## Material and methods:

The criteria for including selected cases in the research were the documentation concerning the circumstances of the death as well as the preliminary results of the autopsy. Whole blood, vitreous humor and pericardial fluid were tested. The study and control group consisted of 54 and 50 cases respectively. The material was used to determine early markers of myocardial damage (highly sensitive troponin I, CK-MBmass, H-CCP, h-FABP using the enzyme linked fluorescent assay (ELFA) and ELISA techniques.

## Results:

There were no statistically significant differences ( $p\text{-value} < 0,05$ ) between the study and the control group in terms of the analyzed cardiac markers (highly sensitive troponin I, CK-MB, H-CCP, h-FABP).

A statistically significant difference in the concentration of h-FABP was demonstrated between the biological matrices (pericardial fluid > serum > vitreous humor) in both, the control and study groups.

In the control group, the older the patient was, the higher the concentration of H-CCP and H-FABP in the vitreous humor were reported. In addition the longer the post-mortem interval, the higher the concentration of CK-MB in the vitreous humor was reported. In the study group respectively, the longer the post-mortem interval, the lower the HCCP concentration value in the pericardial fluid was shown.

The deceased from the control group, whose underwent cardiopulmonary resuscitation, had a statistically significant higher mean concentration of H-CCP in the pericardial fluid compared to the non-resuscitated.

It was statistically significant that in cases, where macroscopic changes in the cardiovascular system were observed during forensic autopsy mean concentration of H-CCP in vitreous humor was higher compared to deaths without such changes in the control group.

In the control group it was observed that the higher the concentration of H-CCP in the vitreous humor, the higher the concentration of CK-MBmass in the same matrix. In the study group, it was observed that the higher the serum concentration of H-CCP, the higher the concentration of H-FABP in the same biological material.

There were no statistically significant differences between the study and control group when calculating the ratio between H-FABP and H-CCP in different biological materials.

The concentration of CK-MB in the vitreous humor measured shortly after death is higher in patients with macroscopic changes in the cardiovascular system observed during autopsy. The concentration of CK-MB in this group is the higher the longer time passes from death to the autopsy. However, the dynamics of the increase in CK-MB concentration depending on PMI (post-mortem interval) is much higher in patients without macroscopic changes in the cardiovascular system visualized during autopsy. The concentration of CK-MBmass in the vitreous humor 2 days after the death increases quite dynamically in cases of cadavers without macroscopic changes in the cardiovascular system, compared to those with visible changes.

The presence of morphological markers of chronic myocardial ischemia and hypoxia in the histopathological examination causes a 36-fold increase in the probability of recognizing sudden cardiac death as the cause of death in forensic opinion.

The macroscopic changes described during forensic autopsy were visualized more often in the study group than in the control group in a ratio of almost 8 to 1. The probability of being included in the research group increases with the age, and the difference of e.g. 10 years generates an increase in risk by approx. 35 %.

Conclusions:

1. The methods for determining troponin I and CK-MBmass concentration using the ELFA technique, that have been proven and validated in blood collected ante-mortem (for clinical diagnostic), are not applicable in the case of postmortem diagnostics.

2. The determination of cardiological markers both, in blood and in other alternative biological materials collected during the forensic medical autopsies seems to be, for today's analytical possibilities and knowledge in the field of thanatodiagnostics, useless in cases where an autopsy is performed in Polish reality on average 5-6 days after death.

3. In the current organizational and legal situation of Polish Forensic Medicine, the introduction of the routine use of thanatochemical diagnostics seems to be exceptionally limited to individual cases when the postmortem interval (PMI) is less than 48 hours, and thus may turn out to be unprofitable for routine use.

4. The obtained data show that the PMI-dependent rise of CK-MB concentration in vitreous humor is much higher in the control group compared to the study group. It seems necessary to perform a detailed analysis of the dynamics of changes in the concentration of individual cardiological markers in various biological materials in order to eliminate the falsely elevated results and the possible misinterpretation of the final cause of death.

5. The presence of human copeptin and h-FABP was demonstrated in both, blood and other tested materials. The use of these alternative markers of myocardial damage and in-depth research in this field may support the further development of laboratory thanatodiagnosis of sudden cardiac deaths.