

Józefa Krystyna Sadlik, Zuzanna Brożek-Mucha

Badania materiału biologicznego pochodzącego ze zwłok generała Władysława Sikorskiego na obecność trucizn nieorganicznych i okrzemek

Analysis of biological material originating from the body of general Władysław Sikorski for inorganic poisons and diatoms presence

Z Instytutu Ekspertyz Sądowych im. prof. dra Jana Sehna w Krakowie
Dyrektor: dr hab. M. Kała

W pracy przedstawiono wyniki badań materiału biologicznego pochodzącego ze zwłok generała Władysława Sikorskiego. Badaniom na obecność metali i arsenu poddano wycinki wątroby, nerki, jelit i płuc, a w kierunku obecności okrzemek – próbki wątroby, jelita, nerki, płuc, żołądka i szpiku kostnego. W wyniku analiz nie wykryto obecności As, Co, Ni, Tl w żadnym z badanych materiałów, Hg w wątrobie, jelicie i płucach oraz Pb w jelicie i płucach. Zawartość Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Sr i Zn we wszystkich materiałach oraz Hg w nerce i Pb w nerce i wątrobie nie wskazywała na zatrucie wymienionymi metalami i As. Okrzemek w analizowanym materiale nie stwierdzono.

Results of the analysis of biological materials originating from the body of general Sikorski are presented in the paper. Samples of the liver, kidney, intestine and lung were analysed for metals and As content, and samples of the lung, liver, kidney, stomach, intestine and bone marrow – for diatoms presence. The analysis for metals and As was performed by atomic absorption spectrometry (AAS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Before the analysis, the samples were wet digested by the classic and microwave assisted method. The analysis did not result in detecting the presence of As, Co, Ni, and Tl in any of the studied materials, while Hg was not revealed in the liver, intestines and lung and Pb in the intestines and lung. The content of Ba, Cd, Cr, Cu, Fe,

Mn, Sr and Zn in all the studied materials, Hg in the kidney, and Pb in the liver and kidney did not indicate poisoning by the above-mentioned metals or arsenic. No diatoms were found in the studied materials.

Słowa kluczowe: materiał po ekshumacji, metale, arsen, stężenia, okrzemki
Key words: exhumed material, metals, arsenic, concentrations, diatoms

WPROWADZENIE

Związki metali, głównie metali ciężkich, np. Hg, Pb, Cd oraz As, który zaliczany jest do półmetali, należą do grupy trucizn nieorganicznych. Pierwiastki te mają zdolność do kumulacji w organizmie, zwłaszcza w narządach mięsnych i nie ulegają w nim rozkładowi. Inne związki zaliczane do grupy trucizn nieorganicznych – substancje żrące, toksyczne aniony i gazy, np. kwasy, zasady, azotyny, azotany, cyjanki, siarkowodór ulegają w organizmie żywym i w materiale biologicznym *in vitro* przemianom i rozkładowi.

Interpretacja wyników analizy chemiczno-toksykologicznej na obecność metali opiera się w konkretnym przypadku, m.in. na porównaniu ich stężeń ze stężeniami jakie spotyka się zazwyczaj w materiale pochodzącym od osób nie narażonych na związki metali oraz ze

stężeniami spotykanymi w przypadkach zatruc takich związkami. Należy przy tym zaznaczyć, że danych na temat stężeń metali w narządach wewnętrznych, zarówno normalnie występujących, jak i tych, które występują w przypadkach zatruc w piśmiennictwie krajowym i zagranicznym jest stosunkowo mało [1].

Test okrzemkowy – badanie na obecność okrzemek, jednokomórkowych organizmów występujących powszechnie w środowiskach wodnych, jest przeprowadzany w diagnostyce śmierci z utonięcia [2–8]. Błona komórkowa okrzemek zawiera duże ilości krzemionki (około połowy suchej masy), tworząc rodzaj skorupki. Podczas procesu tonięcia okrzemki przedostają się wraz z wodą do płuc i żołądka, a także po przejściu przez barierę pęcherzyków płucnych do krwiobiegu, dlatego mogą być obecne w innych narządach [2, 4, 6]. Ze względu na trwałość swoich skorupki i odporność na działanie różnych związków chemicznych, w tym kwasów, okrzemki mogą być wyizolowane z materiału pobranego ze zwłok. Jeśli zostaną wykryte w treści żołądka stanowiącej tzw. „płyn topliwczy”, w płucach i w innych organach wewnętrznych, mogą potwierdzać diagnozę śmierci z utonięcia, zwłaszcza w powiązaniu z innymi badaniami sądowo-lekarskimi zwłok, badaniami histologicznymi, toksykologicznymi oraz ustaleniami dotyczącymi wszystkich okoliczności zdarzenia. Zastosowanie testu okrzemkowego w diagnostyce śmierci z utonięcia wzbudza pewne kontrowersje ze względu na możliwość otrzymania fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. Błędnie ujemne wyniki testu okrzemkowego mogą być związane, m.in. z niską zawartością (gęstością) okrzemek w wodzie, występowaniem w niej gatunków okrzemek trudno penetrujących bariery pęcherzyków płucnych, natychmiastowym zgonem lub szybką utratą przytomności po wpadnięciu osoby do wody. Jeśli ofiara utonięcia była nieprzytomna w momencie znalezienia się w wodzie, wyniki testu okrzemkowego będą również ujemne.

Opisane w niniejszej pracy badania były częścią wielokierunkowej analizy chemiczno-toksykologicznej oraz innych badań przeprowadzonych w celu wyjaśnienia przyczyny zgonu generała Władysława Sikorskiego.

CEL BADAŃ

Celem badań narządów wewnętrznych pobranych podczas sekcji zwłok generała było:

1. przeprowadzenie analizy chemiczno-toksykologicznej w kierunku zawartości As,

Cd, Hg, Pb i Tl, które należą do najbardziej toksycznych metali oraz Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn,

2. przeprowadzenie analizy na obecność okrzemek.

MATERIAŁ I METODY

Badanie w kierunku zawartości metali i As

Badany materiał stanowiły wycinki wątroby, nerki, jelit i płuc.

Analizy wykonano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej, techniką płomieniową (F-AAS) przy zastosowaniu spektrometru AAS SP-9 800 firmy Pye-Unicam (Wielka Brytania) oraz metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzaną emisyjnie (ICP-OES), przy zastosowaniu aparatu ICP-OES firmy Thermo Electron, iCAP 6300 DUO z detektorem CID, pracującym w trybie równoczesnym. Analizę metodą F-AAS przeprowadzono w kierunku zawartości Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Tl i Zn, natomiast metodą ICP-OES na zawartość As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sr, Tl i Zn.

Przed oznaczeniem próbki badanych materiałów mineralizowano na mokro metodą klasyczną oraz metodą z zastosowaniem mikrofal. Mineralizację klasyczną przeprowadzono mieszaniną kwasu azotowego i siarkowego w aparatach Bethgego, z obiegiem zamkniętym, a do mineralizacji pobierano 10 g tkanki. Końcowa objętość mineralizatów wynosiła 20 ml. Mineralizację mikrofalową przeprowadzono w mineralizatorze MLS 1200 Mega, firmy Milestone (Włochy), za pomocą kwasu azotowego i nadtlenu wodoru. Do analizy pobierano po około 0,5 g badanych materiałów. Próbki mineralizowano zgodnie z 5-cio etapowym programem: 1) czas – 2 min, moc 250 W; 2) 2 min, 0 W; 3) 6 min, 250 W; 4) 5 min, 400 W; 6) 5 min, 650 W. Otrzymane mineralizaty uzupełniano do objętości 10 ml.

Badanie w kierunku obecności okrzemek

Badaniom na obecność okrzemek poddano próbki płuc, wątroby, nerki, żołądka, jelita i szpiku kostnego. Do badań pobrano po 2,0 g wycinków płuc, wątroby, nerki i jelita oraz 1,6 g szpiku kostnego i 0,8 g żołądka. Próbki poddano procedurom mającym na celu wyizolowanie szkieletów okrzemek z badanych materiałów. Obejmowały one ogrzewanie z kwasem azotowym, aż do rozpląnięcia się tkanki, a następnie wirowanie i przepłukiwanie pozostałych po roztwarzaniu kwasem azotowym osadów wodą i etanolem. Po odparowaniu etanolu otrzymane

osady poddano analizie za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego JSM-5800, firmy Jeol, sprzężonego ze spektrometrem promieniowania rentgenowskiego Inca Energy, firmy Oxford Instruments.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badanie w kierunku zawartości metali i As

W wyniku analiz nie wykryto obecności: As, Co, Ni, Tl w żadnym z badanych materiałów oraz Hg w wątrobie, jelicie i płucach, Pb w jelicie i płucach. Obecność Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Sr i Zn, wykazano we wszystkich badanych materiałach a także Hg w wycinkach nerki, a Pb w wycinkach wątroby i nerki.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli I. W celach porównawczych, w tabeli II ujęto wyniki opublikowane przez różnych autorów [9-14], a dotyczące stężeń metali normalnie spotykanych w narządach wewnętrznych. Stężenia wykrytych w niniejszym przypadku metali nie odbiegały w sposób zasadniczy od przedstawionych stężeń porównawczych. Podwyższone stężenia ($\mu\text{g/g}$) w stosunku do stężeń porównawczych stwierdzono dla:

- Cr we wszystkich badanych materiałach, to jest w wątrobie – 1,27, nerce – 3,11, jelicie – 1,54 oraz płucach – 1,81; stężenia te około 2–3-krotnie przewyższały stężenia porównawcze,

- Cu w nerce – 12,8, wątrobie – 12,8, jelicie – 5,80 oraz płucach – 5,59; stężenia te podobnie jak stężenia Cr około 2-3-krotnie przewyższały stężenia porównawcze.

Podwyższenie stężeń Cr i Cu jest najprawdopodobniej związane ze znacznym wysuszeniem badanych materiałów, a nie z podwyższonym narażeniem na związki tych metali. W przypadkach zatruc związkami Cr, stężenie tego metalu w materiale biologicznym wielokrotnie przewyższa jego naturalne stężenia. W zatruciach związkami Cu, jej stężenie może niewiele odbiegać od najwyższych normalnie występujących stężeń tylko w niektórych wyjątkowych przypadkach [1, 15]. Zakresy stężeń Cr i Cu w przypadkach śmiertelnych zatruc ich związkami, zebrane na podstawie doświadczeń własnych i innych autorów, ujęto w tabeli III. W tabeli tej dodatkowo przedstawiono zakresy stężeń As, w przypadkach zatruc śmiertelnych [16], które wielokrotnie przewyższają stężenia naturalne.

Badanie w kierunku obecności okrzemek

Badania na obecność okrzemek w analizowanych materiałach dały wyniki ujemne. W żadnym z preparatów uzyskanych z 2 g próbek płuc, wątroby, nerki i jelita oraz 1,6 g próbki szpiku kostnego i 0,8 g żołądka nie wykryto okrzemek.

Ujemne wyniki testu okrzemkowego, w niniejszym przypadku, nie potwierdzają ani też

Tab. I. Stężenie ($\mu\text{g/g}$) metali w badanym materiale.

Tab. I. Concentration ($\mu\text{g/g}$) of metals in the investigated material.

Metal	Materiał Material			
	Wątroba Liver	Nerka Kidney	Jelito Intestine	Płuca Lungs
As	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Ba	0,12	0,33	0,087	0,022
Cd	3,09	41,9	0,11	0,80
Co	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cr	1,27	3,11	1,54	1,81
Cu	9,50	12,8	5,80	5,59
Fe	29,0	30,2	25,1	32,0
Hg	< LOD	1,70	< LOD	< LOD
Mn	0,33	0,69	0,78	0,56
Ni	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Pb	1,18	1,16	< LOD	< LOD
Sr	0,11	0,16	0,32	0,19
Tl	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Zn	49,7	128,0	13,9	21,2

< LOD – nie wykryto powyżej granicy wykrywalności (LOD): As 0,04; Co 0,03; Hg 0,09; Ni 0,07; Pb 0,08, Tl 0,07 $\mu\text{g/g}$

< LOD – not detected above limit of detection (LOD): As 0,04; Co 0,03; Hg 0,09; Ni 0,07; Pb 0,08, Tl 0,07 $\mu\text{g/g}$

Tab. II. Zawartość ($\mu\text{g/g}$, średnia \pm SD, zakres) As i innych metali w próbkach wątroby, nerki, jelit i płuca, według różnych autorów [9-14].

Tab. II. Content ($\mu\text{g/g}$ mean \pm SD, range) of As and other metals in the liver, kidney, intestine and lung samples according to other authors [9-14].

Metal	Wątroba Liver			Nerka Kidney		
	[9]	[10]	[11-14]	[9]	[10]	[11-14]
As	0,033–0,070	0,82 \pm 0,82	–	0,045–0,095	0,78 \pm 0,80	–
Cd	5,7 \pm 4,6 1,1–23,0	3,00 \pm 2,4	3,3 0,2–8,8	47 \pm 24 10,0–94,0	33,00 \pm 17	24,1 0,6–104
Cr	0,066 \pm 0,053 0,015–0,23	0,42 \pm 0,24	–	0,076 \pm 0,059 0,015–0,22	0,27 \pm 0,21	–
Cu	9,9 \pm 5,5 2,1–23,0	5,6 \pm 2,8	3,47 \pm 1,51 1,10–7,70	2,6 \pm 0,28 1,8–3,4	1,8 \pm 0,54	2,15 \pm 0,90 0,26–5,59
Fe	–	192 \pm 91	–	–	83 \pm 35	–
Hg	0,47 \pm 0,26 0,16–1,3	0,22 \pm 0,22	0,015 \pm 0,010 0,003–0,055	1,1 \pm 0,67 0,18–2,6	0,33 \pm 0,31	0,036 \pm 0,032 0,003–0,170
Mn	0,45–2,1	1,5 \pm 0,57	–	0,11–1,0	0,99 \pm 0,31	–
Ni	0,028–0,22	0,15 \pm 0,23	–	0,012–0,30	0,21 \pm 0,31	–
Pb	0,16–1,0	0,34 \pm 0,34	0,35 0,04–1,8	0,16–1,23	0,44 \pm 0,53	0,21 0–1,1
Zn	21–81	49 \pm 20	37,1 \pm 117,3 11,0–78,8	27–95	41 \pm 15	32,5 \pm 10,7 10,8–60,9
Metal	Jelito Intestine			Płuco Lung		
	[9]	[10]	[11-14]	[9]	[10]	[11-14]
As	0,090–0,11	–	–	0,044–0,065	0,95 \pm 1,1	–
Cd	1,1 \pm 0,44 0,39–1,9	–	–	0,72 \pm 0,52 0,15–2,3	0,30 \pm 0,27	–
Cr	0,013–0,48	–	–	0,051–0,81	0,57 \pm 0,40	–
Cu	2,1 \pm 0,48 1,3–3,2	–	1,54 \pm 1,19 0,65–6,80	1,3 \pm 0,24 0,81–1,9	0,97 \pm 0,57	1,91 \pm 1,30 0,51–4,50
Fe	–	–	–	–	237 \pm 98	–
Hg	0,069 \pm 0,037 0,024–0,19	–	0,003 \pm 0,003 0–0,014	0,080 \pm 0,054 0,015–0,30	0,15 \pm 0,19	0,003 \pm 0,002 0,002–0,009
Mn	0,12–2,3	–	–	0,067–0,38	0,23 \pm 0,17	–
Ni	0,05–0,29	–	–	0,038–0,44	0,24 \pm 0,35	–
Pb	0,16–1,3	–	–	0,098–0,81	0,30 \pm 0,26	–
Zn	17–37	–	14,3 \pm 4,60 8,15–28,1	8,9–25	10 \pm 4,0	11,2 \pm 3,90 4,92–18,7

– brak danych

– no data

Tab. III. Stężenie ($\mu\text{g/g}$) Cr, Cu i As w narządach wewnętrznych w przypadkach śmiertelnych zatruc ich związkami [1, 15, 16].

Tab. III. Internal organ concentration ($\mu\text{g/g}$) of Cr, Cu, and As in cases of lethal poisoning by their compounds [1, 15, 16].

Metal Autor, liczba przypadków Author, number of cases	Materiał / Material			
	Wątroba / Liver	Nerka / Kidney	Jelito / Intestine	Płuca / Lungs
Cr (n=6)	24,4–167	20,3–179,4	3,7–14,4	–
Cu (n=6)	8,3–80,0	8,9–61,2	8,7–19,3	–
As (n=7)	8,9–202	4,4–239	8,2–2330	–

– brak danych

– no data

nie wykluczają możliwości zgonu z utonięcia, ze względu na opisaną na wstępie możliwość otrzymania fałszywie ujemnych wyników testu.

WNIOSKI

Podsumowując, przeprowadzone badania wycinków narządów wewnętrznych generała Sikorskiego, pobranych z jego zwłok ponad 60 lat po zgonie, nie wskazały na jego zatrucie związkami As i innych metali. Ujemny wynik badań na obecność okrzemek nie dał podstaw do wnioskowania odnośnie okoliczności jego zgonu.

PIŚMIENNICTWO

1. Sadlik J. K.: Interpretacja wyników analizy chemiczno-toksykologicznej i opiniowanie w zatruciach związkami nieorganicznymi, Arch. Med. Sąd. Krym., 2007, LVII, 215-219.

2. Lunetta P.: Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning, Int. J. Legal Med., 1998, 111, 229-237.

3. Pollanen M. S.: Diatoms and homicide, Forensic Sci. Int., 1998, 91, 29-34.

4. Ludes B., Coste M., North N. et al: Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning, Int. J. Legal Med., 1999, 112, 163-166.

5. Piette M. H.: Drowning still a difficult autopsy diagnosis, Forensic Sci. Int., 2006, 163, 1-9.

6. Horton B. P., Boreham S., Hillier C.: The development and application of diatom-based quantitative reconstruction technique in forensic science, J. Forensic Sci., 2006, 51, 643-650.

7. Ming M., Meng X., Wang E.: Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms, Forensic Sci. Int., 2007, 170, 29-34.

8. Sadlik J. K., Brożek-Mucha Z., Kała M.: Test okrzemkowy w diagnostyce śmierci z utonięcia,

Problems of Forensic Sciences, 2009, artykuł przyjęty do druku.

9. Sumino K., Hayakawa K., Shibata T., Kitamura S.: Heavy metals in normal Japanese tissues, Arch. Environ. Health, 1975, 30, 487-494.

10. Yoo Y., Lee S., Yang J., et al: Distribution of heavy metals in normal Korean tissues, Problems of Forensic Sciences, 2000, 43, 283-289.

11. Lech T., Sadlik J. K.: Total mercury levels in human autopsy materials from a nonexposed polish population, Arch. Environ. Health, 2004, 59, 50-54.

12. Lech T., Sadlik J. K.: Copper concentration in body tissues and fluids in normal subjects of southern Poland, Biol. Trace Elem. Res., 2007, 118, 10-15.

13. Lech T., Sadlik J. K.: Zinc concentration in human autopsy tissues and body fluids, Cell Biol. Toxicol., 2008, 24, (Supplement 1), S82.

14. Sadlik J. K., Kobylecka K., Markiewicz J., et al.: The concentration of cadmium, zinc, lead and copper in internal organs of inhabitants of southern Poland, Proceedings of the 33rd Internal Meeting of TIAFT, 113-115, Thessaloniki, 1997.

15. Sadlik J. K.: A case of fatal poisoning by wood impregnation liquid containing compounds of chromium, copper and boron, Problems of Forensic Sciences, 2002, XLIX, 128-139.

16. Kobylecka K., Sadlik J. K.: Research into arsenic poisoning carried out at the Institute of Forensic Research in Cracow, Proceedings of the 31st Internal Meeting of TIAFT, 331-333, Leipzig 1993.

Adres autora:

Józefa Krystyna Sadlik
Instytut Ekspertyz Sądowych
31-033 Kraków
ul. Westerplatte 9
jsadlik@ies.krakow.pl