



Praca oryginalna
Original paper

Rafał Skowronek¹, Joanna Nowicka¹, Ewa Czech², Joanna Kulikowska¹

Ocena przydatności metody radioimmunometrycznej do oznaczania stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej *post mortem*: badania wstępne

Evaluation of the usefulness of the immunoradiometric method for post-mortem measurement of insulin concentration in the intraocular fluid: preliminary results

¹Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

²Zakład Histologii, Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

¹Chair and Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice, Poland

²Department of Histology, Chair of Histology and Embryology, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice, Poland

Streszczenie

Wstęp: W praktyce medyczo-sądowej rzadkie przypadki związane z samobójczym, zbrodniczym lub przypadkowym przedawkowaniem insuliny należą do trudnych pod względem analitycznym i opiniodawczym. Oznaczanie insuliny we krwi sekcyjnej, głównie ze względu na zachodzące tanatochemiczne procesy degradacyjne (zwłaszcza hemolizę), ma ograniczoną wartość diagnostyczną i w praktyce medyczo-sądowej jest nieprzydatne.

Cel pracy: Celem pracy były: 1) ocena przydatności metody immunoradiometrycznej – wykorzystywanej dotąd w badaniach klinicznych – do pomiaru stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej *post mortem*, 2) wstępna ocena przydatności uzyskanych wyników w orzecznictwie toksykologiczno- i medyczo-sądowym oraz 3) potwierdzenie na własnym materiale słuszności cytowanych danych literaturowych dotyczących wpływu hemolizy na wynik oznaczenia insuliny we krwi sekcyjnej.

Materiał i metody: Materiał badawczy stanowiły 93 próbki płynu z gałki ocznej pobrane w czasie sądowo-lekarskich sekcji zwłok przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Dodatkowo analizie poddano 10 próbek krwi obwodowej pobranej od osób żywych w celach kliniczno-diagnostycznych – od 5 kobiet i 5 mężczyzn. Do oznaczeń wykorzystano zestawy Insulin(e) IRMA KIT firmy IMMUNOTECH.

Wyniki: W 86 (92,5%) próbkach stężenie insuliny było niższe niż czułość analityczna metody (poniżej 0,5 μ IU/ml), natomiast w 7 przypadkach zawierało się w przedziale 1,42–24,42 μ IU/ml.

Wnioski: Oznaczenie stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej metodą immunoradiometryczną daje szansę na obiektywne potwierdzenie zatrucia, jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: cukrzyca, przedawkowanie, diagnostyka pośmiertna, tanatobiochemia, sądowo-lekarska sekcja zwłok.

Abstract

Introduction: In medicolegal practice, rare cases associated with suicidal, criminal or accidental overdose of insulin are both analytically and forensically challenging. The determination of insulin in post-mortem blood has limited diagnostic value, mainly on account of post-mortem chemical degradation processes (particularly hemolysis), and hence is not useful in medicolegal practice.

Aim of the study: The aims of the study were: 1) to assess the usefulness of the immunoradiometric method, used in clinical practice, for post-mortem measurement of insulin concentration in the intraocular fluid, 2) to preliminarily evaluate the usefulness of the obtained results for toxicological and medicolegal assessment, and 3) to verify on the basis of our own material the validity of the cited literature data on the effect of hemolysis on the result of insulin level determination in post-mortem blood.

Material and methods: The study material consisted of 93 samples of intraocular fluid collected during consecutive medicolegal autopsies performed in the Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, Medical University of Silesia in Katowice. In addition, 10 samples of peripheral blood taken from living people (5 women and 5 men) for clinical and diagnostic purposes were analyzed. Insulin(e) IRMA KIT from IMMUNOTECH was used for the analyses.

Results: In 86 (92.5%) samples, the insulin concentration was below the analytical sensitivity of the method (less than 0.5 $\mu\text{IU/ml}$), while in 7 cases it was in the range of 1.42–24.42 $\mu\text{IU/ml}$.

Conclusions: Determination of the insulin level in the intraocular fluid by the immunoradiometric method provides an opportunity for objective verification of poisoning, however this claim requires further research.

Key words: diabetes, overdose, post-mortem laboratory diagnostics, thanatobiochemistry, medicolegal autopsy.

Wstęp

Insulina jest polipeptydowym hormonem zbudowanym z 51 aminokwasów, wytwarzanym przez komórki β wysp trzustkowych poprzez enzymatyczne odszczepienie z macierzystej cząsteczki proinsuliny. Funkcjonalnie jest niezbędnym do życia hormonem anabolicznym, odgrywającym zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów, ale także białek i tłuszczów [1]. Jej niedobór jest przyczyną zaburzeń gospodarki węglowodanowej prowadzących do podwyższenia stężenia glukozy we krwi do niebezpiecznych poziomów, a w skrajnych przypadkach – przy bardzo wysokich stężeniach – do stanu zagrożenia życia – śpiączki cukrzycowej [2, 3]. Dlatego preparaty insuliny od wielu lat są stosowane w leczeniu substytucyjnym cukrzycy typu 1, cukrzycy typu 2, cukrzycy po usunięciu trzustki oraz m.in. u osób z późnymi powikłaniami cukrzycy, szczególnie z nefropatią cukrzycową przy niewydolności nerek [4]. Insulina często jest też stosowana jako środek dopingujący w kulturystyce [1, 5].

W praktyce medyczno-sądowej przypadki związane z samobójczym, zbrodniczym lub przypadko-

Introduction

Insulin is a polypeptide hormone composed of 51 amino acids. It is produced by β -cells of the pancreatic islets through enzymatic cleavage from the parent proinsulin molecule. Functionally, insulin is a life-essential anabolic hormone playing a key role in the metabolism of carbohydrates, but also proteins and fats [1]. Insulin deficiency is an abnormality underlying disorders of carbohydrate metabolism leading to an increase in blood glucose concentration to dangerous levels and, in extreme cases, at very elevated blood glucose concentrations, to the life-threatening condition known as diabetic coma [2, 3]. Consequently, insulin medications have been used for many years in the substitution treatment of diabetes mellitus type 1 and type 2, diabetes after pancreas removal and, among others, in people with late complications of diabetes, especially diabetic nephropathy during the period of kidney failure [4]. Insulin is also frequently used for doping purposes in body-building [1, 5].

In medicolegal practice, cases involving suicidal, criminal or accidental overdose of insulin are

wym przedawkowaniem insuliny są rzadkie i trudne pod względem analitycznym i opiniodawczym [6]. Większość przypadkowych przedawkowań nie stanowi zagrożenia dla życia pacjentów, w przeciwieństwie do zatruć intencjonalnych. Pierwszy udokumentowany przypadek zabójstwa z użyciem insuliny pochodzi z 1957 r. (sprawa Kennetha Barlowa) [7]. Marks odnalazł w literaturze 66 przypadków, w których podejrzewano lub potwierdzono przedawkowanie insuliny (zabójstwa, próby zabójstw, przypadki zastępczego zespołu Münchhausena) [8]. Wydaje się jednak, że ryzyko intencjonalnych (samobójczych) przedawkowań insuliny u pacjentów z cukrzycą obu typów jest niedoszacowane.

Badania populacyjne samobójców w północnej Finlandii wykazały, że 3,1% z nich miało cukrzycę (34,6% typ 1, a 65,4% typ 2) [9]. Wśród osób z cukrzycą typu 1 przedawkowanie insuliny jako metoda samobójstwa stanowiło ok. połowę zatruć, zaś u osób z cukrzycą typu 2 – 13%. Obecnie wiadomo, że ryzyko depresji i próby samobójczej jest większe u osób z chorobami przewlekłymi, w tym cukrzycą, zwłaszcza jeśli towarzyszy im nadużywanie substancji psychoaktywnych [10].

Oznaczanie insuliny we krwi sekcyjnej, głównie ze względu na zachodzące pośmiertnie procesy degradacyjne (zwłaszcza hemolizę), ma bardzo ograniczoną wartość diagnostyczną i w praktyce medyczno-sądowej jest nieprzydatne [11, 12]. Zasadne jest więc poszukiwanie i weryfikowanie możliwości wykorzystania materiałów alternatywnych, takich jak płyn z gałki ocznej [13].

Celami pracy były: 1) ocena przydatności metody immunoradiometrycznej – wykorzystywanej dotąd w badaniach klinicznych – do pomiaru stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej *post mortem*, 2) wstępna ocena przydatności uzyskanych wyników w orzecznictwie toksykologiczno- i medyczno-sądowym oraz 3) potwierdzenie na własnym materiale słuszności cytowanych danych literaturowych dotyczących wpływu hemolizy na wynik oznaczenia insuliny we krwi sekcyjnej.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły 93 losowe próbki płynu z gałki ocznej pobrane w czasie sądowo-lekarskich sekcji zwłok przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowej

uncommon, and both analytically and forensically challenging [6]. In contrast to intentional poisoning, most accidental overdoses are not life-threatening to their victims. The first documented case of homicide by insulin dates from 1957 (Kenneth Barlow case) [7]. Marks has identified in the literature a total of 66 cases involving suspected or proven insulin overdose (homicides, attempted homicides, cases of Münchhausen syndrome by proxy) [8]. It seems, however, that the risk of intentional (suicidal) insulin overdose in patients with both types of diabetes is underestimated.

Population-based studies of suicide victims in Northern Finland have shown that 3.1% had diabetes (34.6% diabetes mellitus type 1 and 65.4% type 2) [9]. In victims with type 1 diabetes, insulin overdose as a suicide method represented approximately half of all self-poisoning cases, and in individuals with type 2 diabetes it was 13%. It is currently known that the risk of depression and suicide attempt is higher in patients with chronic diseases – including diabetes – especially if their condition is accompanied by psychoactive substance abuse [10].

The determination of insulin in post-mortem blood has limited diagnostic value, mainly on account of post-mortem chemical degradation processes (particularly hemolysis), and hence is not useful in medicolegal practice [11, 12]. Therefore, it is justified to search for and verify the possibilities for using alternative materials, one of which is intraocular fluid [13].

The aims of the study were: 1) to assess the usefulness of the immunoradiometric method, used in clinical practice, for post-mortem measurement of insulin concentration in the intraocular fluid, 2) to preliminarily evaluate the usefulness of the obtained results for toxicological and medicolegal assessment, and 3) to verify on the basis of our own material the validity of the cited literature data on the effect of hemolysis on the result of insulin level determination in post-mortem blood.

Material and methods

The study material consisted of 93 random samples of the intraocular fluid collected during consecutive medicolegal autopsies performed in the Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, Medical University of Silesia in Kato-

wo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Analizując próbki, *ex ante* nie dokonywano ich selekcji pod kątem podejrzenia czy też braku podejrzenia przedawkowania insuliny.

Dodatkowo analizie poddano 10 próbek krwi obwodowej pobranej w celach kliniczno-diagnostycznych z żył powierzchownych okolicy łokciowej od osób żywych – od 5 kobiet i 5 mężczyzn. Z pobranej krwi w standardowy sposób uzyskano surowicę i krew pełną, a także krew zhemolizowaną (poprzez zamrożenie i rozmrożenie krwi pełnej).

Stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej i krwi oznaczono metodą immunoradiometryczną, wykorzystywaną rutynowo w diagnostyce klinicznej do oznaczania stężenia insuliny *in vitro* w ludzkiej surowicy i osoczu. Zastosowano komercyjne zestawy Insulin(e) IRMA KIT firmy IMMUNOTECH (IM3210) o następujących parametrach (według informacji producenta): czułość analityczna: 0,5 $\mu\text{IU/ml}$, czułość funkcjonalna: 1,04 $\mu\text{IU/ml}$, specyficzność: nie wykazuje reaktywności krzyżowej z ludzką proinsuliną, des 31,32 proinsuliną i C-peptydem, precyzja śródseryjna: współczynniki wariancji poniżej lub równe wartości 4,3%, precyzja międzyseryjna: współczynniki wariancji poniżej lub równe wartości 3,4%, zakres pomiarowy (od czułości analitycznej testu do stężenia najwyższego kalibratora): 0,5–300 $\mu\text{IU/ml}$, norma dla surowicy: poniżej 22 $\mu\text{IU/ml}$.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono wyniki oznaczeń insuliny metodą immunoradiometryczną w próbkach krwi pobranych od osób żywych, z uwzględnieniem rodzaju materiału – surowica, krew pełna i krew zhemolizowana.

Właściwe analizy płynu z gałki ocznej wykazały, że w 86 (92,5%) próbkach stężenie insuliny oznaczone metodą immunoradiometryczną było niższe niż czułość analityczna metody (poniżej 0,5 $\mu\text{IU/ml}$). W 7 przypadkach stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej zawierało się w przedziale 1,42–24,42 $\mu\text{IU/ml}$. Wyniki analizy wraz z indywidualną charakterystyką każdego przypadku zaprezentowano w tabeli II.

Dyskusja

Badania nad oznaczaniem insuliny z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych radioizotopowo,

wice. The consecutive samples were analyzed without their selection on an *ex ante* basis for suspected insulin overdose or the absence of such suspicion.

In addition, a total of 10 samples of peripheral blood taken from the superficial veins in the cubital fossa region in living people (5 women and 5 men) for clinical and diagnostic purposes were analyzed. Collected blood samples were used to obtain, in the standard manner, serum and whole blood, as well as hemolyzed blood (by freezing and thawing whole blood).

The concentration of insulin in the intraocular fluid and blood was determined by the immunoradiometric method which is routinely used in clinical diagnostics for *in vitro* assays of insulin in the human serum and plasma. Insulin(e) IRMA KIT from IMMUNOTECH (IM3210) commercial kits were employed. According to the manufacturer's specifications, the kits are characterized by the following parameters: analytical sensitivity: 0.5 $\mu\text{IU/ml}$, functional sensitivity: 1.04 $\mu\text{IU/ml}$, specificity: no cross-reactivity with human proinsulin, des 31.32 proinsulin and C-peptide, inter-assay precision: coefficient of variation below or equal to 4.3%, intra-assay precision: coefficient of variation below or equal to 3.4%, measuring range (from the analytical sensitivity of assay to the concentration of the highest calibrator): 0.5–300 $\mu\text{IU/ml}$, standard for serum: under 22 $\mu\text{IU/ml}$.

Results

Table I lists the results of insulin determination using the immunoradiometric method in blood samples collected from living individuals. The results are presented according to the type of material: blood serum, whole blood and hemolyzed blood.

Appropriate analyses of the intraocular fluid demonstrated that the insulin concentration determined by the immunoradiometric method was below the analytical sensitivity of the method (under 0.5 $\mu\text{IU/ml}$) in 86 (92.5%) samples. In 7 cases the concentration of insulin in the intraocular fluid was in the range from 1.42 to 24.42 $\mu\text{IU/ml}$. The analysis results together with the individual characteristics of each case are shown in Table II.

Discussion

Research conducted in the 1950s on insulin determination with radiolabeled antibodies marked

Tabela 1. Wyniki oznaczeń insuliny metodą immunoradiometryczną w próbkach krwi pobranych od osób żywych, z uwzględnieniem rodzaju materiału – surowica, krew pełna i krew zhemolizowana

Table 1. Results of insulin determination by the immunoradiometric method in blood samples collected from living individuals, presented according to the type of material – blood serum, whole blood and hemolyzed blood

Lp. No.	Płeć Sex	Wiek (lata) Age (years)	Stężenie insuliny (µIU/ml) Insulin concentration (µIU/ml)		
			Surowica Serum	Krew pełna Whole blood	Krew zhemolizowana Hemolyzed blood
1	K/F	22	6.84	4.38	675.94
2	K/F	34	0.60	< 0.5	570.09
3	K/F	46	6.43	1.43	744.18
4	K/F	33	< 0.5	< 0.5	652.00
5	K/F	34	1.04	< 0.5	692.39
6	M/M	34	12.07	3.39	836.73
7	M/M	42	5.55	4.12	734.55
8	M/M	38	2.44	1.42	671.22
9	M/M	37	0.93	< 0.5	679.33
10	M/M	69	7.41	1.50	866.59

prowadzone w latach 50. XX w., stały się początkiem nowej dyscypliny naukowej i medycznej – radioimmunologii [14]. Jak każda metoda analityczna, także metoda immunoradiometryczna ma swoje ograniczenia.

Uzyskane przez nas wyniki dotyczące oznaczeń stężenia insuliny we krwi metodami radioimmunologicznymi potwierdziły doniesienia literaturowe, że główną przeszkodą uniemożliwiającą otrzymanie prawidłowych i wiarygodnych danych jest hemoliza krwi, która fałszywie zawyża wyniki (tab. I) [11, 12]. Czyni to krew sekcyjną materiałem nieprzydatnym w pośmiertnej diagnostyce przedawkowania insuliny metodą IRMA. Próby określania korelacji stężeń między krwią sekcyjną a płynem z gałki ocznej są więc z góry skazane na niepowodzenie. Zainteresowanie toksykologów sądowych koncentruje się wobec tego na materiałach alternatywnych, a zwłaszcza płynie z gałki ocznej, który – ze względu na swoją anatomiczną izolację oraz małą zawartość różnego rodzaju komórek mogących wpływać na stężenie analitów – wydaje się optymalnym materiałem do oznaczeń tanatobiochemicznych [13].

Przemawiają za tym również uzyskane przez nas wyniki oznaczeń insuliny w płynie z gałki ocznej

the beginning of a new discipline of science and medicine – radioimmunology [14]. Similarly to other analytical methods, the immunoradiometric method has its limitations.

Our results obtained in the determination of blood insulin concentration using radioimmunological methods confirmed the literature reports stating that the main obstacle preventing the acquisition of accurate and reliable results in this material is blood hemolysis, which leads to falsely elevated results (Table I) [11, 12]. Consequently, blood collected at autopsy is an unsuitable material for post-mortem diagnosis of insulin overdose using the IRMA method. Attempts to determine the correlations of concentrations between post-mortem blood and intraocular fluid are, therefore, doomed to failure and unsubstantiated. This is why forensic toxicologists focus their attention on alternative materials, particularly the intraocular fluid which, on account of its anatomical isolation and low content of different types of cells potentially affecting the concentration of analytes, seems to be the optimal material for post-mortem biochemical assays [13].

The above claim is also supported by the results obtained in the present study in insulin determina-

Tabela II. Charakterystyka przypadków, w których określono stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej pobranym podczas sądowo-lekarskiej sekcji zwłok**Table II.** Characteristics of cases in which the concentration of insulin in the intraocular fluid collected during medicolegal autopsy was determined

Lp. No.	Wywiad History	Wynik badania sekcyjnego Post-mortem examination results	Wynik analizy toksykologicznej Toxicology analysis results	Stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej (µIU/ml) Concentration of insulin in intraocular fluid (µIU/ml)
1.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu. W pomieszczeniu zabezpieczono strzykawkę po insulinie. Podejrzanie samobójczego przedawkowania insuliny Body discovered in apartment. Insulin syringe identified on the scene. Suspected suicidal overdose of insulin	Sekcja zwłok nie wyjaśniła przyczyny śmierci Post-mortem examination failed to establish cause of death	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	24.42
2.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu. Chory na cukrzycę Body discovered in apartment. Diabetic patient	Stwierdzono ślady po wkłuciach na brzuchu. Sekcja zwłok nie wyjaśniła przyczyny śmierci Injection marks on the abdomen. Post-mortem examination failed to establish cause of death	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	4.25
3.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu. Osoba nadużywająca alkoholu Body discovered in apartment. History of alcohol abuse	Sekcja zwłok nie wyjaśniła przyczyny śmierci Post-mortem examination failed to establish cause of death	Alkohol: krew – 1,9‰, płyn z gałki ocznej – 1,8‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 1.9‰, intraocular fluid – 1.8‰ Narcotics, drugs – negative test results	5.20
4.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu. Osoba nadużywająca alkoholu Body discovered in apartment. History of alcohol abuse	Zawał mięśnia sercowego Myocardial infarction	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	2.60
5.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu. Osoba nadużywająca alkoholu Body discovered in apartment. History of alcohol abuse	Sekcja zwłok nie wyjaśniła przyczyny śmierci Post-mortem examination failed to establish cause of death	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	1.42

Tabela II. Cd.
Table II. Cont.

Lp. No.	Wywiad History	Wynik badania sekcyjnego Post-mortem examination results	Wynik analizy toksykologicznej Toxicology analysis results	Stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej (μIU/ml) Concentration of insulin in intraocular fluid (μIU/ml)
6.	Wypadek drogowy Traffic accident	Urazy wielonarządowe Multiple organ injury	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	4.52
7.	Zwłoki ujawniono w mieszkaniu Body discovered in apartment	Tętniak Aneurysm	Alkohol: krew – 0,0‰, płyn z gałki ocznej – 0,0‰ Narkotyki, leki – badanie ujemne Alcohol: blood – 0.0‰, intraocular fluid – 0.0‰ Narcotics, drugs – negative test results	3.78

pobranym *post mortem*. Fakt, iż w większości przypadków nie oznaczono insuliny w płynie z gałki ocznej, potwierdza, że jest to metoda przydatna w diagnostyce pośmiertnej jej przedawkowania. Właśnie takich wyników spodziewali się autorzy. Korelują one z wynikami innych badaczy, którzy oznaczali stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej metodą instrumentalną LC-MS/MS [15]. W 2011 r. Thevis i wsp. opublikowali pierwszą udaną analizę płynu z gałki ocznej z wykorzystaniem spektrometrii mas w sprawie dotyczącej przedawkowania insuliny. Stwierdzili oni, że fizjologiczne stężenie insuliny w płynie z gałki ocznej jest poniżej granicy wykrywalności zastosowanej przez nich metody LC-MS/MS [15]. Co ważne, przewagą współczesnych metod chromatograficznych nad metodami immunoradiometrycznymi jest możliwość rozróżnienia poszczególnych rodzajów insuliny (ludzka, zwierzęca, syntetyczne analogi).

Śśród analizowanych przez nas przypadków na szczególną uwagę zasługuje pierwszy, w którym uzyskane od prokuratury informacje na temat prawdopodobnego samobójczego przedawkowania insuliny zostały potwierdzone oznaczeniem jej stężenia w płynie z gałki ocznej oraz z zabezpieczonej przy

tion in the *post-mortem* intraocular fluid samples. The fact that insulin was not identified in the intraocular fluid in the majority of cases confirms that the method is useful in the *post-mortem* diagnosis of insulin overdose. Such results were expected by the authors. The findings correlate with the results obtained by other researchers who measured the concentration of insulin in the intraocular fluid using the LC-MS/MS instrumental method [15]. In 2011 Thevis *et al.* published the results of the first successful analysis of the intraocular fluid performed by mass spectrometry in a case involving insulin overdose. They found that the physiological concentration of insulin in the intraocular fluid was below the limit of detection of the LC-MS/MS method employed in the study [15]. It is important to note that contemporary chromatographic techniques are superior to immunoradiometric methods in that they provide a possibility to differentiate between various types of insulin (human, animal, synthetic analogues).

Out of all the cases analyzed in this study, particularly noteworthy is the first one in which the information provided by the prosecutor's office about the probable suicidal overdose of insulin was cor-

denacie strzykawki. Taka sytuacja w praktyce opiniodawczej, tj. zgodność między informacjami prokuratury, wynikami badań materiału biologicznego pobranego podczas sekcji zwłok i wynikami badań ujawnionych przy zwłokach dowodów rzeczowych, jest sytuacją idealną i zazwyczaj niebudzącą wątpliwości stron procesowych [16].

W drugim przypadku stwierdzono wyższy niż w grupie odniesienia poziom insuliny. Na podstawie informacji o prawdopodobnej cukrzycy oraz zauważonych śladów po wkłuciach na brzuchu można jedynie przypuszczać, że doszło do przypadkowego przedawkowania insuliny, co jest sytuacją spotykaną w praktyce medyczno-sądowej i klinicznej [17, 18].

W kolejnych pięciu przypadkach, w których stwierdzono podwyższony poziom insuliny w płynie z gałki ocznej, nie było informacji na temat przyjmowania jej w celach leczniczych lub w dopingiu. Być może oznaczone stężenie to efekt patologii przed śmiercią lub gwałtownego „uwolnienia” insuliny w stanie agonalnym. W przypadku szóstym (wypadek drogowy) uzyskany wynik w naszej ocenie uzasadniałby uwzględnienie w diagnostyce różnicowej przyczyny wypadku powikłań cukrzycy – przyczyny osobowej wynikającej ze zmian chorobowych. Interpretacja tego typu wyników, w tym ustalenie dokładnych „progów” stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej, wymaga oczywiście przeprowadzenia dalszych ukierunkowanych badań analitycznych na liczniejszej grupie.

Ponieważ w literaturze brakuje danych na temat wyników analizy płynu z gałki ocznej *post mortem* metodą IRMA, powyższe oznaczenia mają istotny walor poznawczy. Nasze badania wykazały, że u większości osób tą metodą nie wykrywa się insuliny w płynie z gałki ocznej, a zatem wykrycie tego polipeptydu może przemawiać za jego podwyższonym, нефизjologicznym stężeniem *ante mortem* (np. stanem niezdiagnozowanej klinicznie hiperinsulinemii u osoby z cukrzycą typu 2).

Oprócz IRMA oraz metody instrumentalnej LC-MS/MS do oznaczenia stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej można zastosować metodę CLEIA (*chemiluminescence enzyme immunoassay*), co potwierdziły badania Palmieré'a i wsp. [19]. Autorzy doszli do wniosku, że metodą CLEIA można uzyskać wyniki porównywalne z metodą LC-MS/MS i metodą immunoradiometryczną, które wspierałyby hipotezę o przedawkowaniu insuliny.

roborated by the subsequent determination of insulin in the intraocular fluid and in the syringe identified next to the body. Such correspondence between the prosecution's information and the results of tests of biological material collected during autopsy and the results of examinations of material evidence identified on the scene is an optimal situation which usually does not give rise to doubts among the parties to legal proceedings [16].

In the second case the insulin level was found to be higher than in the reference group. Based on the information about the victim's probable history of diabetes and injection marks found on the abdomen, one can only assume that an accidental overdose of insulin might have occurred, which is a situation encountered in medicolegal and clinical practice [17, 18].

In another five cases of elevated insulin levels in the intraocular fluid there was no information regarding insulin use for medical purposes or doping in sport. Perhaps the determined level of insulin was due to a pathology present *ante-mortem* or its rapid “release” in the agonal state. In the 7th case (traffic accident), the result obtained in our study justifies the inclusion of diabetic complications in the differential diagnosis of the cause of the accident (a person-related cause involving underlying pathologies). The interpretation of these types of results – including the establishment of precise “thresholds” of insulin concentration in the intraocular fluid – naturally requires further targeted analytical studies in a larger group of subjects.

As there is no data in the literature regarding the results of *post-mortem* analysis of the intraocular fluid by the IRMA method, the above determinations add a significant contribution to the current state of knowledge. Our studies show that the method does not detect insulin in the intraocular fluid in the majority of people, and hence the detection of the polypeptide may suggest its elevated, non-physiological concentration *ante mortem* (e.g. clinically undiagnosed hyperinsulinemia in patients with type 2 diabetes).

In addition to the IRMA technique and the instrumental LC-MS/MS method, the concentration of insulin in the intraocular fluid can also be measured using the CLEIA (*chemiluminescence enzyme immunoassay*) method, which was demonstrated by Palmiere *et al.* [19]. The authors have concluded

Wnioski

Podsumowując, należy stwierdzić, że w przypadkach podejrzenia śmierci z powodu przedawkowania insuliny oznaczenie jej poziomu w płynie z gałki ocznej metodą immunoradiometryczną daje szansę obiektywnego potwierdzenia zatrucia, zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

that CLEIA yields results comparable to the LC-MS/MS method and the immunoradiometric technique, supporting the hypothesis of insulin overdose.

Conclusions

In conclusion, it should be noted that in cases of suspected death from insulin overdose, the determination of insulin level in the intraocular fluid by the immunoradiometric method provides a possibility to objectively confirm poisoning. This claim, however, requires further research.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Insulin. In: Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Thieme D, Hemmersbach P. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010; 209-226.
2. Hess C, Musshoff F, Madea B. Disorders of glucose metabolism-post mortem analyses in forensic cases: part I. Int J Legal Med 2011; 125: 163-170.
3. Musshoff F, Hess C, Madea B. Disorders of glucose metabolism: post mortem analyses in forensic cases: part II. Int J Legal Med 2011; 125: 171-80.
4. Cefalu WT, Leahy JL. Insulin Therapy. CRC Press, New York 2002; 272.
5. Holt RI, Sönksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. Br J Pharmacol 2008; 154: 542-556.
6. Marks V. Hypoglycaemia: accidents, violence and murder. Part 1. Pract Diab Int 2005; 22: 303-306.
7. Marks V, Richmond C. Kenneth Barlow: The first documented case of murder by insulin. J R Soc Med 2008; 101: 19-21.
8. Marks V. Murder by insulin: Suspected, purported and proven – A review. Drug Test Anal 2009; 1: 162-176.
9. Löfman S, Hakko H, Mainio A, Timonen M, Räsänen P. Characteristics of suicide among diabetes patients: A population based study of suicide victims in Northern Finland. J Psychosom Res 2012; 73: 268-271.
10. Russell KS, Stevens JR, Stern TA. Insulin overdose among patients with diabetes: A readily available means of suicide. Prim Care Companion J Clin Psychiatry 2009; 11: 258-262.
11. Chevenne D, Letailleur A, Trivin F, Porquet D. Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. Clin Chem 1998; 44: 354-356.
12. Wunder C, Kauert GF, Toennes SW. Factors leading to the degradation/loss of insulin in postmortem blood samples. Forensic Sci Int 2014; 241: 173-177.
13. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. Forensic Toxicol 2016; 34: 12-40.
14. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest 1960; 39: 1157-1175.
15. Thevis M, Thomas A, Schänzer W, Ostman P, Ojanperä I. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. Drug Test Anal 2012; 4: 53-56.
16. Junge M, Tsokos M, Püschel K. Suicide by insulin injection in combination with beta-blocker application. Forensic Sci Int 2000; 113: 457-460.
17. Batalis NI, Prahlow JA. Accidental insulin overdose. J Forensic Sci 2004; 49: 1117-1120.
18. von Mach MA, Meyer S, Omogbehin B, Kann PH, Weilemann LS. Epidemiological assessment of 160 cases of insulin overdose recorded in a regional poisons unit. Int J Clin Pharmacol Ther 2004; 42: 277-280.
19. Palmiere C, Sabatasso S, Torrent C, Rey F, Werner D, Bardy D. Post-mortem determination of insulin using chemiluminescence enzyme immunoassay: Preliminary results. Drug Test Anal 2015; 7: 797-803.

Rafał Skowronek, Joanna Nowicka, Ewa Czech, Joanna Kulikowska
Ocena przydatności metody radioimmunometrycznej do oznaczania stężenia insuliny w płynie z gałki ocznej post mortem: badania wstępne

Adres do korespondencji

Rafał Skowronek
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej
Wydział Lekarski w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny
ul. Medyków 18
40-752 Katowice, Polska
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

Nadesłano: 2.03.2018

Zaakceptowano: 5.07.2018

Address for correspondence

Rafał Skowronek
Chair and Department of Forensic Medicine
and Forensic Toxicology
School of Medicine in Katowice
Medical University of Silesia
18 Medyków St.
40-752 Katowice, Poland
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

Submitted: 2.03.2018

Accepted: 5.07.2018

