Zagadnienia nauki i zawodu

Entomotoksykologia jako narzędzie w rozwiązywaniu zagadek kryminalnych

KATARZYNA CZEPIEL-MIL, ALEKSANDRA ŁOŚ*, PATRYCJA MARCZEWSKA*

Katedra Zoologii, Ekologii Zwierząt i Łowiectwa, *Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Czepiel-Mil K., Łoś A., Marczevska P.

Entomotoxicology as a tool for solving criminal cases

Summary

Entomotoxicology deals with the analysis of toxic substances contained in arthropods that feed on dead bodies. Arthropods are a source of material for investigation when a human or animal body is in an advanced state of decomposition. Various chemical air pollutants, drugs, xenobiotics and pesticides can accumulate in the bodies of insect larvae. Entomotoxicology often involves examining insect larvae that have introduced to their metabolism various kinds of pharmaceuticals taken by people when they were alive. Chemical compounds which can cause death affect the development rate of arthropods living on corpses, delay colonization of insects by several days, or affect their number. Some compounds act as attractants or repellents and thereby influence how quickly insects appear on the body. Others have a mixed effect on insect development. During the initial development stage of the insect they act as an attractant, but in subsequent stages they slow down its development or act as a repellent. The concentration of chemical compounds accumulated in the bodies of larvae is different than in human tissues. Sometimes insects are better indicators of the presence of chemical compounds than material taken from the internal organs of a dead body. Moreover, the quantity of toxins detected in arthropods differs at different developmental stages. The concentration of a xenobiotic in the body of an insect depends on its type, the stage of development of the insect, and the part of the body it was collected from. Studies have determined that the best place to collect entomotoxicological samples is the internal organs (e.g. the liver). If this is not possible, insects are collected from the head area and the muscles. Due to the low popularity of entomotoxicological testing, this type of evidence often is either not collected at all or collected improperly, preventing valuable information from being obtained. Thus there is a need to verify and standardize methods for safeguarding arthropods for the purposes of entomological toxicology.

Keywords: entomotoxicology, forensic entomology, xenobiotics, necrophagia, drugs and toxins interacting with a developing insects

Entomotoksykologia jest dziedziną nauki łączącą wiedzę entomologiczną z kryminalistyczną oraz medycyną sądową z toksykologią (20). Zajmuje się ona jakościową oraz ilościową analizą substancji toksycznych zawartych w organizmach stawonogów żerujących na martwych ciałach (7). Stawonogi, a w szczególności owady są źródłem materiału badawczego, gdy ciało ludzkie lub zwierzęce uległo zaawansowanemu rozkładowi lub pozostał jedynie szkielet. W ciałach larw owadów mogą gromadzić się różne substancje chemiczne zanieczyszczające powietrze oraz różnego rodzaju ksenobiotyki, jak np.: pestycydy, leki, narkotyki. W entomotoksykologii często bada się larwy owadów, które wprowadzają do swego metabolizmu różnego rodzaju środki farmakologiczne, zażyte za życia przez ludzi (13). Ta dziedzina nauki bada także wpływ substancji na rozwój owadów, możliwość kumulowania się toksyn w organizmach oraz ich znaczenie w określaniu

czasu i przyczyny zgonu, a także do wskazania miejsca śmierci (2).

W entomologii sądowej okres, jaki upłynął od zgonu do momentu ujawnienia zwłok, nazywany jest *post mortem intervallum* (PMI) – pozwala on na ustalenie czasu śmierci (20). PMI dzieli się na podokresy. Przed pojawieniem się owadów na zwłokach (zarówno postaci dorosłych, jak i larwalnych) mówimy o *pre-appearance interval* (PAI) okres, kiedy owady są już obecne nazywamy *presence interval* (PI), a przedział czasu, w którym następuje rozwój postaci larwalnych, to *development interval* (DI) (14). Określenie PMI na podstawie fauny zasiedlającej zwłoki bazuje na wielu założeniach. Podczas ustalania czasu śmierci na podstawie odkrytych na zwłokach owadów analizuje się zróżnicowaną aktywność stawonogów w zależności od pory dnia oraz pogody, czas składania jaj, mieszane populacje owadów, sezonowe różnice w roz-

woju larw, wytwarzanie przez larwy efektu cieplnego, przybywanie nowych gatunków i osobników w różnym czasie, wpływ toksyn na rozwój owadów w kolejnych stadiach rozwoju (3). Pod uwagę bierze się także warunki bytowania owadów, temperaturę, wilgotność i typ siedliska, w którym przebywały zwłoki przez cały okres PMI. Uwzględnienie tak zróżnicowanych czynników zewnętrznych mających istotny wpływ na cykl życiowy owadów nie jest łatwe i często napotyka się na pewne trudności podczas prowadzenia badań i doświadczeń z zakresu entomologii i entomotoksykologii sądowej.

Bardzo ważnym etapem badań jest szybkie rozpoznanie wszystkich gatunków i grup nekrofagicznych na różnych etapach sukcesji. Niezbędna jest także znajomość biologii rozwoju i zachowania się owadów stwierdzonych na zwłokach. Skład fauny zwłok zmienia się w trakcie rozkładu ciała, a czas skolonizowania przez dany zespół gatunkowy jest specyficzny, w związku z tym proces tych zmian można wykorzystać do określenia czasu zgonu. Ponadto, entomolog sądowy na podstawie fauny znalezionej na zwłokach może stwierdzić, czy ciało po śmierci zostało przeniesione z innego miejsca.

Niestety, z powodu dużego podobieństwa między wieloma gatunkami, zwłaszcza jeśli chodzi o larwy muchówek, łatwo o pomyłkę podczas identyfikacji, co może wpłynąć na podanie nieprawidłowej daty zgonu. Tu z pomocą przychodzi nam biologia molekularna, a zwłaszcza rozwój tzw. genoskopii entomologiczno-sądowej, dokonującej identyfikacji materiału entomologicznego i ludzkiego oraz określenia wieku poczwerek (18).

W Polsce pionierem w badaniach z zakresu entomologii sądowej był Edward Niezabitowski, który na początku XX w. stwierdził, że fauna zwłok ludzkich oraz padliny zwierząt kręgowych nie wykazują istotnych różnic (21). W polskiej strefie klimatycznej na martwym ciele wykazano wówczas 31 gatunków owadów. Wraz z rozwojem entomologii sądowej liczba zidentyfikowanych stawonogów poszerzyła się do 57 gatunków (5).

W naszym obszarze geograficznym do najbardziej znanych nekrofagicznych stawonogów należą muchówki (*Diptera*) z rodziny *Calliphoridae* (plujkowate), jak *Calliphora vicina* i *Calliphora vomitoria*, które jako pierwsze kolonizują zwłoki, a więc wiek ich larw wyznacza najbardziej zbliżony czas śmierci. Inne gatunki z tej rodziny to *Lucilia cesar* i *Lucilia sericata*, także powszechne wśród polskich owadów nekrofagicznych. Przedstawicielami owadów kosmopolitycznych, znajdowanych na ciałach w różnych obszarach geograficznych są gatunki z rodziny *Sarcophagidae* (ścierwicowate) lub *Piophilidae* (sernicowate) np.: *Sarcophaga carnaria*, *Piophilidae casei*. Drugą ważną grupą stawonogów notowaną na zwłokach są drapieżcy i pasożyty gatunków nekrofagicznych, najliczniej reprezentowane przez chrząszcze (*Coleoptera*) z rodzin *Silphidae* (omarlicowate), *Staphylinidae* (kusakowate) i *Histeridae* (gnilikowate). Oprócz stawonogów typu nekrofagicznego i drapieżców na martwym ciele znaleźć można gatunki wszystkożerne oraz przypadkowe (5, 21).

Na zróżnicowaną faunę stawonogów żerujących na martwych ciałach ma wpływ, oprócz zewnętrznych czynników środowiskowych, wzajemne oddziaływanie organizmów na siebie. W przypadku badań entomotok-

sykologicznych obecność substancji toksycznych w ciele larw owadów zależy nie tylko od temperatury, wilgotności, promieniowania UV, pH środowiska oraz zwłok, ale również od gatunku larwy czy stadium rozwojowego. Nie należy też zapominać o interakcjach, jakie zachodzą pomiędzy różnymi substancjami w martwym ciele (22). Związki chemiczne, będące przyczyną śmierci, mogą także wpływać na czas rozkładu zwłok, wydłużać go bądź skracać. Niektóre gazy łącząc się z hemoglobina, zmieniają skład chemiczny tkanek i wówczas działają odstraszająco na niektóre nekrofagiczne owady (11).

Entomotoksykologia zaczęła rozwijać się na świecie dopiero pod koniec lat 70. XX w. W 1977 r. w Finlandii w larwach znalezionych na zwłokach, które poddano analizie toksykologicznej, stwierdzono obecność rtęci, a w 1980 r. w USA duże stężenie fenobarbitalu (1, 15). Przeprowadzane wówczas doświadczenia wykazywały obecność metali ciężkich w ciele owadów z rodziny *Calliphoridae* (plujkowate) oraz *Staphylinidae* (kusakowate) żerujących na rybach, u których wykryto rtęć. W wyniku wielu doświadczeń ustalono, że m.in. metale, takie jak: miedź, żelazo, ołów, kadm, bar, antymon, cynk i rtęć, można wykryć na wszystkich etapach cyklu rozwojowego stawonogów padlinożernych, a także w tkankach stawonogów nieżerujących na zwłokach, a żywiących się owadami nekrofagicznymi (8, 11). Kolejne badania z dziedziny entomotoksykologii dotyczyły możliwości wykrywania różnych substancji w organizmach owadów. Dowiodły one, że te drobne zwierzęta gromadzą w swoim ciele nie tylko metale ciężkie. Lata badań na różnych gatunkach owadów z całego świata pozwoliły zidentyfikować obecność zróżnicowanych środków farmakologicznych w ich organizmach. Analizie poddano substancje o różnym stopniu toksyczności, najczęściej leki psychotropowe oraz środki uzależniające, tj.:

- etanol,
- fenobarbital (środek nasenny, uspokajający),
- arsenik,
- malation (insektycyd),
- benzodiazepiny (np.: triazolam, temazepam i oxazepam – środki przeciwlękowe, nasenne),
- barbiturany (np.: fenobarbital – działanie nasenne, uspokajające; secobarbital, amylobarbital i barbital, a także barbiturany sodowe),
- cykliczne antydepresanty (np.: alimemazyna, trimipramina i klomipramina),
- bromazepam (lek psychotropowy, przeciwlękowy),
- lewomepromazyna (związek o działaniu przeciwpyszotycznym),
- nortryptylina i amitryptylina (leki przeciwdepresyjne),
- kokaina (także jej pochodną benzoylecgoninę),
- opiaty/opioidy (morfina, kodeina, propoksyfen),
- pochodne amfetaminy (MDMA, MDA),
- trazodon (lek przeciwdepresyjny),
- niektóre salicylany,
- THC-COOH i 11-Hydroxy-THC (związki z grupy kannabinoidów),
- meprobamat (pochodna karbaminianu, która jest stosowana jako lek przeciwlękowy),
- digoksyna (związek uzyskiwany z naparstnicy welnistej stosowany do leczenia niewydolności serca),

- a także nefopam (nieopiodowy lek przeciwbólowy) (8, 10, 22).

Metody badań nie potwierdziły obecności w organizmach owadów m.in. następujących związków:

- paracetamolu,
- aspiryny,
- amylobarbitalu (środek uspokajający),
- tiopentonu (lek usypiający),
- loprazolamu (środek przeciwlękowy, uspokajający)
- oraz diazepam (związek przeciwdrgawkowy, uspokajający) (8, 10, 22).

Na obecnym etapie doświadczeń nie można być całkowicie pewnym, że wymienione związki chemiczne będą obecne w ciele larw owadów innych niż te, które analizowano do tej pory. W wielu krajach badania przeprowadza się na zróżnicowanych stadiach rozwojowych i na różnych gatunkach owadów, wykorzystując różne sposoby analizy. Należałoby ujednolicić metody badań, aby ich wyniki mogły być wykorzystane jako dowód kryminalistyczny.

Niektóre substancje toksyczne wpływają na tempo rozwoju stawonogów bytujących na zwłokach, hamują kolonizację owadów o kilka dni lub wpływają na ich liczbę (11). Oddziaływanie takich związków chemicznych jest widoczne bez względu na możliwość ich wykrycia w organizmie owada. Dodatkowo różne związki mogą działać jako atraktanty lub repelenty i tym samym wpływają na szybkość pojawiania się owadów na zwłokach – może to wydłużyć lub skrócić okres PAI. Zaburzenia rozwoju owadów oraz wpływ na ich pojawianie się na zwłokach mają istotne znaczenie w ustalaniu czasu zgonu. Rozwój gatunków stawonogów o znaczeniu sądowym jest przyspieszany przez takie substancje, jak np.: kokaína, amitryptylina, metylenodioksymetamfetamina (w skrócie MDMA – środek halucynogeny), paracetamol. Przykładem ksenobiotyków działających jak repelenty – opóźniających i zaburzających kolonizację zwłok – są: malation, arsen, tlenek węgla, butylobromek hioscyny (lek zmniejszający napięcie mięśni gładkich), hydrokortyzon („hormon stresowy”) czy zwykła benzyna. Niektóre substancje wywołują efekt mieszany na rozwój kolejnych stadiów owadów, np.: relanium, fencyklidyna (substancja psychoaktywna), metamfetamina, heroína, diazepam (związek przeciwdrgawkowy, uspokajający). W początkowym stadium rozwojowym owada działają jako atraktanty, a w kolejnych stadiach spowalniają jego rozwój lub działają odstraszająco (12, 19).

W rezultacie licznych doświadczeń stwierdzono, że wykorzystanie stawonogów do badań ilościowych jest trudniejsze niż entomotoksykologiczne analizy jakościowe. Stężenie związków chemicznych skumulowanych w ciałach larw jest inne niż w tkankach ludzkich (11). Wyniki doświadczeń wykazały, że różne ilości związków chemicznych wykrywano w zachowanych narządach wewnętrznych zwłok i w organizmie żerujących na nich owadów nekrofagicznych. Zdarza się, że owady są lepszymi wskaźnikami występowania związków chemicznych niż materiał pobrany z narządów wewnętrznych zwłok. Przykładem może być wykrycie triazolamu u larw muchówek (*Diptera*), a niestwierdzenie go w nerkach i śledzionie pobranych z martwego ciała (10). Ponadto, istnieje różnica pomiędzy ilościami toksyn wykrywanych w różnych stadiach rozwojowych stawonogów. Koncentracja związków

chemicznych w poczwarkach jest niższa niż w larwach, jednakże poczwarki są lepszym materiałem badawczym ze względu na powtarzalność wyników uzyskiwanych z ich wykorzystaniem. Poczwarki pierwszego pokolenia pobrane z silnie rozłożonych zwłok są lepszym wskaźnikiem niż poczwarki z kolejnych pokoleń. Nadal nie wiadomo, w której części ciała owady magazynują związki chemiczne będące w kręgu zainteresowań kryminologów (8). Nie wszystkie też związki, nawet te śmiertelne dla człowieka, są kumulowane w organizmach larw muchówek nekrofagicznych (10). Kwestia ilościowych i jakościowych analiz entomotoksykologicznych jest więc otwarta i stanowi obiecujące pole do badań.

Obecnie, w zależności od potrzeb, analizie toksykologicznej można poddać każdy materiał entomologiczny, zarówno dorosłe owady (*imagines*), larwy, poczwarki, kokony (*puparia*), wylinki (*exuviae*), fragmenty owadów (np. odnóży) czy nawet ich odchody (19). Należy jednak pamiętać, że ksenobiotyk jest wykrywalny tylko wtedy, gdy stopień jego absorpcji przewyższa stopień przemian metabolicznych. W zależności od substancji, jakiej poszukujemy, stosuje się różne metody ekstrakcji (ciecz–ciecz, do fazy stałej, precypitację) oraz odmienne procedury analityczne (najczęściej chromatografię gazową lub cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas). Aktualnie jednak w badaniach toksykologicznych zaleca się pobieranie owadów tylko w przypadku, kiedy zwłoki uległy zaawansowanemu procesowi gnilnemu i niemożliwe jest uzyskanie materiału do badań z narządów wewnętrznych (4). Analiza pobranego materiału musi zostać przeprowadzona jak najszybciej, gdyż związki chemiczne mogą być wydalone lub ulegają biotransformacji, a to może doprowadzić do inaktywacji lub aktywacji metabolicznej związków. Ponadto, stężenie ksenobiotyku w organizmie owada zależy od jego rodzaju oraz stadium rozwojowego owada i miejsca żerowania na zwłokach, z którego został zebrany. Utrudnieniem w badaniach entomotoksykologii jest także słaby stopień poznania podstawowych procesów fizjologicznych nekrofagów, jak: metabolizm, bioakumulacja i wydalanie ksenobiotyków (8).

Najczęściej stosowanymi metodami badań w entomotoksykologii są: analizy radioimmunologiczne (RIA), chromatografia gazowa (GC), chromatografia cienkowarstwowa (TLC), wysokosprawną chromatografię cieczową, spektrometria mas (MS) oraz połączenie chromatografii cieczowej (HPLC-MS). Jakościowym badaniom toksykologicznym poddawane są zwykle homogenizowane larwy. Najczęściej są to larwy muchówek (*Diptera*), gdyż są najliczniejsze na rozkładających się ciałach (11).

Metoda radioimmunologiczna (RIA – Radio Immuno Assay) polega na wykrywaniu reakcji antygenu ze swoistym dla niego przeciwciałem w oparciu o pomiar radioaktywności izotopu promieniotwórczego, którym wyznaczony jest jeden ze składników reakcji (przeciwciało bądź antygen). RIA służy do oznaczeń ilościowych, jest metodą o wysokiej czułości i specyficzności, stosowaną często do oznaczania stężeń hormonów, autoprzeciwciał, leków czy witamin. Najczęściej stosowanymi izotopami do znakowania są: ^{125}I (promieniowanie gamma), ^{131}I , ^{14}C , ^3H (promieniowanie beta). Znakowanie trytem stosuje się przy związkach drobnocząsteczkowych, a jod wykorzystuje się do znakowania antygenów białkowych. Do

przeprowadzenia testu stosuje się wyznakowane i niewyznakowane antygeny, które konkurują o wiązanie się z przeciwciałami. Następnie niezwiązany antygen jest rozdzielany i poddawany pomiarowi radioaktywności (24).

Chromatografia należy do technik analitycznych umożliwiających identyfikację, rozdzielenie oraz oczyszczanie mieszanin związków chemicznych. W zależności od rodzaju nośnika wyróżniamy kilka rodzajów chromatografii. W chromatografii gazowej (GC) fazą ruchomą jest gaz (najczęściej hel, argon, azot wysokiej czystości, rzadziej wodór), a fazą stacjonarną adsorbent lub absorbent, pokrywający nośnik i wypełniający kolumny lub jej ścianki. Technika GC umożliwia ustalenie procentowego składu mieszanin związków chemicznych, w których występuje ich nawet kilkaset. Stosując klasyczną detekcję (np. z użyciem katarometrów), można dokonać orientacyjnej identyfikacji składników mieszaniny na podstawie ich czasów retencji. Przykładem wykorzystania tej metody było użycie próbek krwi, wątroby, serca, nerek i mózgu ofiary nadużywającej narkotyków oraz larwy płujek, w których znaleziono morfinę i fenobarbiturany (10).

W przypadku chromatografii cienkowarstwowej (TLC) fazą rozdzielczą jest złożo, jest to faza stacjonarna o właściwościach sorpcyjnych, np. żel krzemionkowy, tlenek glinu, rzadziej celuloza lub ziemia okrzemkowa. Złożo jest umieszczone jako cienka (0,01-2 mm) warstwa na płytce szklanej, aluminiowej lub wykonanej z tworzywa sztucznego. Substancje rozdzielane nanosi się punktowo w pewnej odległości od dolnej krawędzi płytki, po czym płytkę umieszcza się w komorze chromatograficznej zanurzonej na kilka milimetrów w eluencie (fazie ruchomej), tak by naniesione substancje nie zostały zanurzone. Eluent stopniowo wznosi się po płytce dzięki zjawisku kapilarnemu. Powoduje to przemieszczanie się rozdzielanych substancji ku górze (17). Podobnie przeprowadza się rozdział w komorach poziomych, w których faza ruchoma dostaje się ze zbiorniczka umiejscowionego na jednym z boków do płytki ułożonej poziomo (6). Identyfikacja substancji odbywa się przez wykorzystanie charakterystycznej dla nich barwy. Jeśli składniki analizowanej mieszaniny po naniesieniu na warstwę chromatograficzną są barwne, otrzymujemy chromatogram w postaci barwnych plamek. W przypadku, gdy wszystkie składniki mieszaniny nie dają na płytce widocznych plamek, przeprowadza się wizualizację nazywaną także wywoływaniem chromatogramów. Chromatogramy spryskuje się chemicznymi odczynnikami wywołującymi, które w reakcji z poszczególnymi substancjami dają barwne plamki. Można je też zanurzyć na określony czas w roztworach odczynników chemicznych lub naczyniu wypełnionym odczynnikiem w postaci gazowej (np. amoniak, pary jodu lub bromu). Wybierając odczynnik do wizualizacji chromatogramów nie należy zapominać o tym, że może on reagować z chromatografowanymi substancjami. Dobrą metodą wizualizacji chromatogramów jest zastosowanie promieni UV. Jeżeli adsorbent na płytce pokryty jest czynnikiem fluoryzującym, to cała płytka fluoryzuje pod wpływem promieniowania o określonej długości fali. Przy rozdzielaniu substancji znakowanych izotopami promieniotwórczymi chromatogram można wizualizować przy pomocy kliszy światłoczułej. Przykłada się ją do płytki chromatograficznej, a następnie wywołuje, uzyskując odbicie chromatogramu. Istnieje

także ciekłokrystaliczna metoda wizualizacji substancji chromatografowanych, którą można zastosować do wszystkich rodzajów adsorbentów. Polega ona na nasyceniu ciekłym kryształem porowatej, przezroczystej folii. Po umieszczeniu jej w świetle spolaryzowanym przyjmuje ona jednakową barwę na całej powierzchni. Folię dociska się do płytki chromatograficznej, a wówczas substancje znajdujące się na płytce w postaci plamek przechodzą do ciekłego kryształu, którego struktura przekształca się w ciecz izotropową. Na folii pojawiają się plamki identyfikowanych substancji o barwie różniącej się w świetle spolaryzowanym od tła, są one jednocześnie odbiciem chromatogramu znajdującego się na płytce (23). Dzięki chromatografii cienkowarstwowej wykryto fenobarbital w larwach *Cochliomyia macellaria* (Calliphoridae) znalezionych na zwłokach kobiety, której ciało znajdowało się w stadium wczesnej szkieletyzacji i nie można już było pobrać do badań typowych płynów i narządów (10).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC (high-performance liquid chromatography) to odmiana chromatografii cieczowej, zaliczająca się do rodzaju chromatografii kolumnowej, gdzie analizowana próbka rozpuszczana jest w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku, zależnym od właściwości substancji i zastosowanego układu (czasem stosuje się fazę ruchomą) i w formie roztworu o znanym stężeniu i objętości jest kierowana na kolumnę, która wypełniona jest specjalnym złożem porowatym lub żelowym. Rolę cieczy nośnej (fazy ruchomej) pełni odpowiednio dobrana mieszanina (tzw. eluent). Na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych między związkami chemicznymi będącymi składnikami analizowanej próbki a wypełnieniem kolumny następuje ich rozdział. HPLC różni się od zwykłej chromatografii cieczowej ciśnieniem, pod jakim podawany jest eluent na kolumny. Są to dość znaczne ciśnienia, przekraczające 100 atm. Wysokie ciśnienie w układzie HPLC wynika z budowy pomp HPLC (wąskie przekroje kapilar), uziarnienia wypełnienia kolumn (kilka mikrometrów) i przepływu fazy ruchomej (16). Przykładowo, tą metodą w zwłokach znalezionych dwa miesiące po śmierci wykryto w narządach wewnętrznych, jak serce, płuca, wątroba, śledziona i nerki, oraz w larwach płujek związki, tj.: triazolam i oxazepam, fenobarbital, alimemazynę i klomipraminę. W innym przypadku w obojczyku i tkance mózgowej ofiary stwierdzono obecność bromazepamu i lewomepromazyny w larwach sernicy pospolitej (*Piophilha casei*) (10).

Spektrometria mas (MS, MassSpectrometry) jest metodą spektroskopową, szeroko rozpowszechnioną i uniwersalną techniką analityczną. Polega na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Warunkiem koniecznym jest, aby wszystkie analizowane cząsteczki posiadały ładunek elektryczny. Spektrometr mas działa poprzez odchyłanie strumienia jonów badanej substancji w polu elektrycznym. Wewnątrz spektrometru mas panuje próżnia, dzięki czemu ruch jonów nie jest zakłócany przez zderzenia z cząsteczkami gazów (9). Metodą spektrometrii masowej wykryto np. nortryptylinę we fragmentach mięśni, kościach, skórze i włosach ofiary oraz w larwach muchówek zebranych z niej. Innym przykładowym związkiem znalezionym m.in. tą metodą jest kokaina. Obecność jej wykryto w rozkładających się mięśniach szkieletowych narkomana i larwach na nich żerujących (10).

W przypadku analiz mających na celu identyfikację substancji zwykle ma się do czynienia z mieszaninami związków chemicznych. Identyfikacja wielu związków chemicznych znajdujących się w jednej próbce jest zwykle niemożliwa, jeśli stosuje się tylko spektrometr mas. Problem ten można rozwiązać, łącząc spektrometrię mas z różnymi technikami rozdzielania substancji, zwykle z chromatografią gazową GC bądź wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). W układzie takim wszystkie substancje wychodzące z chromatografu kierowane są do źródła jonów w spektrometrze mas. Podczas analizy mieszanin z chromatografu wydostają się kolejne, rozdzielone substancje. Spektrometr nie analizuje całej mieszaniny w jednym momencie, tylko kolejno poszczególne związki chemiczne (9).

Zróznicowana ilość substancji toksycznych w ciele owadów zależy od miejsca, z którego te owady zostały zebrane. Owady do badań mogą być pobrane z wnętrza ciała, a także w przypadku silnie rozłożonych zwłok ze środowiska je otaczającego oraz bezpośrednio spod zwłok lub padliny. Owady zebrane z różnych części ciała zwłok zawierają w swoim ciele zróznicowaną ilość substancji toksycznych. W żywym organizmie człowieka lub zwierzęcia związki chemiczne są rozpraszane i odkładane w różnych częściach ciała w różnych ilościach. W wyniku badań ustalono, że najlepszym miejscem do pobrania próbek entomotoksykologicznych są narządy wewnętrzne (np. wątroba), a w przypadku, gdy pobranie takiego materiału jest niemożliwe, owady zbieramy z okolic głowy oraz mięśni. Wciąż nieustalona jest minimalna liczebność pobranej próbki oraz optymalny wiek (stadium) pobieranych stawonogów (8). Błędem kryminologów jest zbieranie owadów tylko z powierzchni ciała – skóry lub sierści. Tak zebrane stawonogi nie są wartościowym materiałem badawczym, otrzymane wyniki analiz są negatywne, a określenie PMI na ich podstawie niemożliwe. Ważnym elementem, o którym należy pamiętać przy zbieraniu każdego rodzaju materiału dowodowego, jest sposób jego zabezpieczenia. Należy dokładnie opisać miejsce ciała, z którego został pobrany materiał, jak również geograficzną i siedliskową lokalizację samych zwłok oraz stopień ich zaciemnienia lub nasłonecznienia. Do chwili, w której przeprowadzane są badania, owady pobieramy żywe i w różnych stadiach rozwoju. Testy z zakresu toksykologii entomologicznej powinny zostać przeprowadzone jak najszybciej po zabezpieczeniu materiału, aby skumulowana w ciele owada substancja nie uległa rozkładowi. Ze względu na małą popularność badań entomotoksykologicznych, materiał dowodowy nie jest pobierany w ogóle, albo jest pobierany w sposób niewłaściwy, co nie pozwala na uzyskanie cennych informacji. Konieczna jest więc weryfikacja metod zabezpieczenia stawonogów do celów toksykologii entomologicznej oraz ich ujednolicenie.

Entomotoksykologia jest dziedziną nauki wymagającą współpracy entomologów z toksykologami. Przybywając na miejsce zdarzenia entomolog udziela informacji odnośnie do znalezionych gatunków owadów oraz ich stadium rozwojowego, toksykolog zaś po wykonaniu odpowiednich analiz informuje, czy stwierdzono obecność ksenobiotyków, a jeśli tak, to jakiego rodzaju, w jakim stężeniu oraz z jakiej tkanki materiał został pobrany.

Obecnie obserwuje się bardzo dynamiczny rozwój entomologii medyczno-sądowej na świecie. Pociąga to za sobą coraz dokładniejsze badania ułatwiające dochodzenie. Nowe technologie, projekty badawcze wzbogacają wiedzę na temat biologii i ekologii stawonogów, które mają znaczenie dla prawa. W Polsce, współpraca naukowców z różnych dziedzin oraz częstsze wykorzystywanie metod entomologicznych do zabezpieczania śladów podczas rozwiązywania spraw kryminalnych może przyczynić się do prężnego rozwoju entomotoksykologii.

Piśmiennictwo

1. Beyer J. C., Enos W. F., Stajic M.: Drug identification through analysis of maggots. *J. Forensic Sci.* 1980, 25, 411-412.
2. Campobasso C. P., Gherardi M., Caligara M., Sironi L., Introna F.: Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *Int. J. Legal Med.* 2004, 118, 210-214.
3. Catts E. P.: Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. *J. Agric. Entomol.* 1992, 9(4), 245-255.
4. Dinis-Oliveira R. J., Carvalho F., Duarte J. A., Remião R., Marques A., Santos A., Magalhães T.: Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol. Mech. Methods* 2010, 20, 363-414.
5. Draber-Mońko A.: Stawonogi występujące na zwłokach. Wprowadzenie do entomologii sądowej. Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego 2010, s. 21-77.
6. Dzido T. H., Polak B.: Methodical Possibilities of the Horizontal Chambers in PLC, Preparative Layer Chromatography. Kowalska T., Sherma J. (ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA 2006.
7. Gagliano-Candela R., Avenaggiato L.: The detection of toxic substances in entomological specimens. *Int. J. Legal Med.* 2001, 114, 197-203.
8. Gosselin M.: Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Science International* 2011, 208, 1-9.
9. Johnstone R. A. W., Rosse M. E.: Mass spectrometry for chemists and biochemists. Press Syndicate of the University of Cambridge 1996; Bal K., Daniewski M. K. (tłum.): Spektrometria mas. Wyd. Naukowe PWN 2001.
10. Kaczorowska E.: Badania nad gromadzeniem związków chemicznych w organizmach owadów. Wprowadzenie do entomologii sądowej. Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego 2010, s. 166-168.
11. Kaczorowska E.: Pojęcie entomotoksykologii. Wprowadzenie do entomologii sądowej. Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego 2010, s. 164-165.
12. Kaczorowska E.: Wpływ związków chemicznych na tempo i czas rozwoju stadiów preimaginealnych muchówek nekrofagicznych. Wprowadzenie do entomologii sądowej. Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego 2010, s. 168-171.
13. Kapil V., Reject P.: Assessment of Post Mortem Interval, (PMI) from Forensic Entomotoxicological Studies of Larvae and Flies. *Entomol Ornithol Herpetol* 2013, 2, 104.
14. Matuszewski Sz., Bajerlein D., Konwerski Sz., Szpila K.: Entomologia sądowa w Polsce. *Wiad. entomol* 2008, 27, 49-52.
15. Nuorteva P.: Sarcosaprophagous insects as forensic indicators, [w:] Tedeschi C. G. (red.): *Forensic Medicine: A Study in Trauma and Environmental Hazards*. Vol. V. Death. Saunders W. B. Philadelphia 1977, s. 1072-1095.
16. Rumiński J. K.: HPLC. Wysokosprawną chromatografią cieczową. UMK, Toruń 2004.
17. Sherma J., Fried. B.: Handbook of thin-layer chromatography. New York: Marcel Dekker 2003.
18. Skowronek R.: Co nowego w molekularnej entomologii sądowej? *Genetyka i prawo* 2012, 2(15), 14-15.
19. Skowronek R.: Entomotoksykologia sądowa. Wykorzystanie entomologii w kryminalistyce i medycynie sądowej. Wyd. Śląski Uniwersytet Medyczny 2013, s. 125-130.
20. Skowronek R.: Podstawowe pojęcia entomologiczne i medyczno-sądowe. Wykorzystanie entomologii w kryminalistyce i medycynie sądowej. Wyd. Śląski Uniwersytet Medyczny 2013, s. 117-119.
21. Skowronek R., Chowanec C.: Polska entomologia sądowa – rys historyczny, stan obecny i perspektywy na przyszłość. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2010, LX, 55-58.
22. Tracqui A., Keyser-Tracqui C., Kintz P., Ludes B.: Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *Int. J. Legal. Med.* 2004, 118, 194-196.
23. Witkiewicz Z.: Podstawy chromatografii. Wyd. Naukowo-Techniczne 2000, s. 442.
24. Yalow R. S., Berson S. A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 1960, 39, 1157-1175.

Adres autora: dr Katarzyna Czepiel-Mil, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: kasiamil.mil@gmail.com