

CURRENT STATE AND PROSPECTS OF FORENSIC-MEDICAL DIAGNOSIS OF DROWNING: A REVIEW OF THE LITERATURE

Volodymyr M. VOLOSHYNOVYCH¹, Natalia M. KOZAN¹, Viktoriia M. VOLOSHYNOVYCH², Julia Z. KOTSYUBYNSKA¹, Marian S. VOLOSHYNOVYCH³, Galina M. ZELENCHUK¹, Valeriia O. CHADIUK¹

¹ Department of Forensic Medicine and Medical Law, Ivano-Frankivsk National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, Ukraine

² Department of Pediatrics, Ivano-Frankivsk National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, Ukraine

³ Department of Dermatology and Venereology Ivano-Frankivsk National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Abstract

The article describes the current possibilities of forensic medicine in the diagnosis of death by drowning, as well as reflects the different views of the authors and the evolution of approaches to this issue. Despite the constant interest of scientists in the topic of drowning and extensive research on this issue, there are still many white spots. Researchers are trying to identify more specific changes characteristic of drowning and possible methods to detect them.

The main evidence based method of diagnosing drowning at present is the detection of diatomic plankton in the tissues of isolated kidneys by light optical microscopy. However, microscopic examination and identification of diatomic plankton require a lot of time and accurate taxonomic examination. Also, a disadvantage of this method is that the methods of processing the material sent for research, as a result of the use of concentrated acids for the destruction of organs, greatly complicates and sometimes eliminates the possibility of detection of diatomic plankton. In some cases, the presence of diatoms during drowning is so small that it is impossible to detect them by microscopy. In such cases, the presence of phytoplankton DNA detected by PCR in tissues during drowning is almost the only method for diagnosing drowning.

Nowadays there has been a lack of research in the field of forensic medicine related to the use of evidence-based medicine, especially in the field of drowning.

Keywords

Drowning; Forensic pathology; Polymerase chain reaction; Diatomic plankton; Evidence-based medicine; Forensic medicine.

Received 14 April 2022; accepted 22 June 2022

Introduction

Asphyxia due to drowning, as a type of violent death, occurs when a person is immersed in water (rarely in another liquid) and is accompanied by acute dysfunction of vital body systems under the influence of the drowning environment. Asphyxia due to

drowning, as one of the causes of death, is a serious social problem due to the frequent deaths of people on the water, mostly young people (Tester, Kopplin, Creighton, Burke, Ackerman, 2005). Risk factors for drowning include inadequate supervision of children, recreational or occupational access to water, risk-taking behavior, and underlying medical conditions

(Main, Hooper, 2017). People with epilepsy drown at a rate nearly ten times greater than the general population (1.5 per 10,000 epilepsy person-years compared to the estimated provincial average of 0.13 per 10,000; Bain et al., 2018). Drowning deaths in people with epilepsy most often occur in the bathtub.

According to the World Health Organization's preventing drowning practical guidance, 230,000 people worldwide die each year from drowning (WHO – World Health Organization). Drowning, as one of the types of asphyxia, accounts for about 1/3 of all cases of asphyxia. More than 90% of drowning deaths are recorded in low- and middle-income countries. However, the risk of drowning may also be higher depending on age (Quan, 2003; Alsaif et al., 2018). Certain types of human activities and the territory of their residence (Carvalho, Kennedy, Woodroffe, 2019), migration processes (Pavlidis, Karakasi, 2019), festive periods such as public holidays (Saunders, Adriaanse, Simons, Niekerk, 2018) have an impact on increasing the number of cases of drowning. Male sex, older age, foreign nationality, and cardiovascular disease predisposed individuals to an elevated risk of fatal submersion (Kevrekidis et al., 2020).

According to the latest WHO data published in 2020, drownings deaths in Ukraine reached 2,312 or 0.41% of total deaths. The age adjusted death rate is 4.69 per 100,000 of population ranks Ukraine number 31 in the world (WHR – World Health Rankings). In Ukraine's neighboring countries this figure is 0.78 cases in Hungary, 1.39 cases in Poland, 2.12 cases in Slovakia, 2.55 cases in Romania.

The analytical method of literature review is used in the work. We conducted a comprehensive substantive analysis and generalization of a large number of primary documents, carried out their critical reasoned assessment. Substantiated conclusions contain new scientifically significant facts and ideas on the problem of forensic-medical diagnosis of drowning.

Forensic-medical diagnosis of drowning

Examination concerning drowning remains was one of the most difficult examinations, and its conduct even now causes difficulties (Xu, Hu, Shen, Pan, Zhou, 2011).

Proper forensic diagnosis is very important to determine the cause of death in water due to acute pathological conditions of the cardiovascular and respiratory systems, injuries, as well as cases of post-mortem submersion of bodies in water to hide the traces of the crime. In such situations, the most important task is to

establish the fact of drowning, the place of drowning (Saini, Khanagwal, Singh, 2017), whether a person got into a reservoir during his lifetime, thanatogenesis of death, finding out other causes that contribute to the development of drowning.

Diagnosis of drowning is logically divided by its types. According to the classification of Isaev and Sveshnikov, four main types of drowning in water can be distinguished: aspiration, spastic (asphyxial), reflex (syncopal), and mixed type (Isaev, Sveshnikov, 1988).

1. Aspiration type of drowning is characterized by the ingress of water into the airways and lungs with the subsequent development of asphyxia due to airway closure.

When drowned in freshwater, fluid penetrates the small alveoli with their subsequent rupture due to hydrostatic pressure, water entering the general bloodstream, which causes hemodilution (Piette, De Letter, 2006). The most drowning victims die acutely of electrolyte imbalance and ventricular fibrillation. The duration of the drowning period is 3–5 minutes. When drowned in salt (sea) water, the fluid from the bloodstream enters the lumen of the alveoli due to osmotic pressure, thereby causing the process of acute pulmonary edema (Maeda et al., 2009). Cardiac arrest, as a rule, as a result of asystole develops gradually, within 7–8 minutes with increasing myocardial hypoxia. Cardiac activity stops after 10–20 seconds after a respiratory arrest.

2. Spastic (asphyxial) type of drowning is characterized by the emergence of persistent laryngospasm in response to irritation of the receptors of the laryngeal mucosa by the drowning environment, which also triggers the mechanism of asphyxia due to airway obstruction. The experimentally proven spasm lasts about 2 minutes, then it is replaced by other pathological mechanisms, such as vasovagal cardiac arrest, which reflexively occurs when the fluid comes into contact with the upper respiratory tract (Bierens, Lunetta, Tipton, Warner, 2016). The duration of the drowning period is 5.5–12.5 minutes.

Cardiac arrest occurs against the background of arterial hypotension for 20–40 s. later respiratory arrest. According to various authors, the spastic type of drowning occurs from 35% to 61% of deaths (Ferrara et al., 2013).

3. Reflex (syncopal) type of drowning is characterized by an abrupt cessation of respiratory and cardiac activity. An important role is played by the emotional background (feelings of fear, panic), as well as the presence of comorbidities. Given this, it would be more correct to speak not of drowning, but death in the water. Reflex type of drowning occurs in an average

of 5% of cases and is more common in children and women (Carballeira, Vieira, Febrero-Bande, Muñoz Barús, 2018).

4. Mixed type of drowning occurs in an average of 35% of observations and is characterized by polymorphism of the detected signs, which is associated with a combination of different types of death. Most often, this type of drowning can begin with laryngospasm, and then there is a transition to later phases of drowning, water enters the airways and lungs with the development of phenomena inherent in the aspiration type of drowning (Isaev, Sveshnikov, 1988).

When corpses are found in water, there are two possible causes of death. The first – the cause of death is not associated with direct exposure to water, and the second – drowning. The first option includes all cases of post-mortem submersion of the body in water, which is characterized only by the presence of signs of the body in the water. The presence of additional cargo tied to the corpse is not always an evidence of a forced immersion in water. Perhaps this is a way of committing suicide or posthumously hiding a corpse (Schnepppe, Dokter, Bockholdt, 2020). Numerous cases of death in water due to acute pathological conditions of the cardiovascular and respiratory systems, injuries, as well as cases of post-mortem submersion of bodies in water to hide the traces of the crime, greatly complicate the diagnosis of drowning.

Circumstances of death that suggest the death of drowning are the retrieval of a corpse from large bodies of water, detection on the shores of bodies of water, or in artificial containers with water or near them. The depth of the reservoir does not play a decisive role; it is enough to immerse the head or just block the airways with fluid. In this case, the helpless state of the victim (alcohol or drug intoxication, unconsciousness, disability, etc.) is crucial. Physically healthy people are also at risk of drowning, and even professional swimmers can drown. The risk increases with the development of asphyxiation and reflex types of drowning, in particular with a sudden and unexpected immersion in water, when, as a rule, the victim becomes helpless and loses the ability to use swimming skills.

Diagnosis of drowning is a complete medicolegal autopsy combined with a thorough scene investigation and comprehensive toxicology/histology, with perhaps the most important item being as much history about the event and the deceased as can be gathered.

In this regard, the diagnosis of asphyxia due to drowning is a diagnosis of exclusion and is established by refuting other causes of death, and therefore there is always the possibility of misdiagnosis. Detection of signs of death that contradict drowning helps to

determine the cause of death, but the question remains about the lifelong entry of individuals into the aquatic environment and its impact on the development of the immediate cause of death. Numerous internal and external signs of drowning have already been described to determine death by drowning. However, they are expected to be influenced by various factors that reduce their significance and provability (Schnepppe et al., 2020).

Diagnosis of drowning consists of a set of non-specific signs, each of which is not a reliable confirmation of the diagnosis.

Macroscopic changes

External inspection begins with an inspection of clothing, which in most cases is wet, with traces of sand or aquatic plants (algae). The skin is usually pale, the corpse is cold by the touch, on the palmar and plantar surfaces of the skin maceration is visible – so-called ‘washerwoman’s hands’ (Figure 1) and ‘washerwoman’s feet’ (Figure 2).

The combination of these features in one or another combination is common to all types of drowning, as



Figure 1. Maceration of the palmar surface of the hand, the so-called ‘washerwoman’s hands’.

well as post-mortem submersion of the body in water, and mostly indicates only the presence of the corpse in the water, especially in cold water. The most valuable feature is a stable fine-bubbled foam that protrudes from the mouth and nasal passages (Kanchan, Saraf, Ateriya, 2018). Another study found experimentally that foam around the mouth and nose cannot form due to the body being in the water. The foam was also detected in the case of the drowning of experimental animals (Reijnen, Vos, Buster, Reijnders, 2019). However, foaming may also occur with cardiogenic shock, pulmonary edema, epilepsy, intoxication, or electric shock.

The presence of general asphyxiation signs, which are detected during an internal examination, is characteristic of all types of drowning. Such signs include dark liquid blood, overflow of the blood of the right half of the heart, plethora of internal organs, anemia of the spleen, subpleural and subepicardial hemorrhage (Bierens et al., 2016), subconjunctival hemorrhage, hemorrhage under the sclera of the eyes, cyanosis of the face, involuntary urination, the act of defecation, ejaculation, discharge of the mucous plug of the cervix in women. The nature of cadaveric spots can vary: from intense spilled (in the asphyxial type of drowning) to light pink (in the aspiration type of drowning, due to dilution of blood with water).

An internal examination reveals a drowning environment in the stomach with a characteristic admixture



Figure 2. Maceration of the plantar surface of the feet, the so-called 'washerwoman's feet'.

of sand, silt, and algae – a sign of Fagerlund. Three basic levels of the gastric content after sedimentation: foam on the top, liquid in the middle and a solid component – Wydler's sign (Gotsmy et al., 2019). With the asphyxial type of drowning, there is a lot of fluid in the stomach, and with the aspiration type of drowning – a little. The possibility of postmortem penetration of fluid into the gastrointestinal tract is denied by most authors. Among the internal general asphyxiation signs are the following: Paltauf's-Reiter-Wachholz sign – hemorrhages in the sternocleidomastoid muscle, muscles of the neck, chest, back, including the shoulder blades (Oshima, Ohtani, Mimasaka, 2019). Muscular hemorrhages in muscles were not a result of agonal convulsions but were caused by the consciously active excessive motion of the upper extremities while drowning.

Ulrich's sign is a massive hemorrhage into the middle ear cavity, the bony auditory canal is characteristic of a sharp immersion to a great depth. Moro's sign – accumulation of a small amount of fluid in the abdominal cavity – confirms only the presence of the corpse in the water, develops after 6–8 hours.

The aspiration type of drowning (drowning in freshwater) is characterized by a stable fine-bubbled foam with a pink tinge mushroom-shaped or in the form of a 'snow cap'. Fine bubble foam in the upper respiratory tract, possibly with impurities of bottom soil and aquatic vegetation (Krushevsky's sign). Moreover, it was found that the presence of foam around the mouth and nose, the so-called outer foam, indicates drowning (Figure 3). The foam in the airways, the so-called inner foam, indicates that the body is in the water (Reijnen et al., 2019).

The lungs are enlarged, have more weight, due to which they almost fill the pleural cavity. Lung tissue is hyperhydrated due to the penetration of fluid from the drowning environment – the so-called 'balloon view'. On the posterolateral surfaces of the lungs, under the visceral pleura are large vague hemorrhages of pale red color in the form of stripes or spots (so-called Rasskazov-Lukomsky-Paltauf spots; Yang, Choi, Lee, Yoo, 2018).

When drowned in salt water (seawater), there are processes of hemoconcentration of arterial blood with increased viscosity and hypovolemia. In the lungs, there is a picture of acute lung injury (ALI) in the form of focal atelectasis, sharp edema, and multiple hemorrhages with a significant decrease in the airiness of the lung tissue (Liu et al., 2014). The foam, which is found in the airways and lungs, has a small bubble appearance and a bright white color as a result of inspiratory dyspnea. Water actively enters the respiratory tract,

irritates the mucous membranes of the trachea and large bronchi, causing coughing movements. At the same time mucus which mixes with water and air is allocated, forming foam weight of grayish-white color filling the gleam of respiratory tracts. Diatom test, the study of the state of electrolyte balance of blood, does not reveal noticeable changes. Thus, the diagnostic substantiation of expert opinions on the causes of death is carried out mainly in connection with changes in the lungs (Miyazato, Ishikawa, Michiue, Maeda, 2012).

In the asphyxial type of drowning, laryngospasm leads to several processes that are characteristic of this type of drowning. First, it is a decrease in pressure in the nasopharynx, which leads to a difference in pressure with the environment, and the flow of fluid into the sinus of the main bone (Sveshnikov's sign), and traces of fluid can be found in the frontal sinus and middle ear cavity maxillary and sphenoidal sinuses (Kawasumi et al., 2012). But in fact, the Sveshnikov's sign is associated with the length of the body's submersion in the water. The longer the body is in the water, the more likely it is that water will enter the sinuses.

Secondly, it is the occurrence of expiratory dyspnea, which leads to hyperaeration of the lungs, the development of acute emphysema and their increase in volume, rupture of the interalveolar septa with the



Figure 3. Foam around the mouth and nose.

occurrence of small focal hemorrhages. The lungs acquire a 'marble appearance', increased airiness, fill almost the entire pleural cavity, on the lateral surfaces there are imprints of ribs. In the trachea and bronchi, small bubble foam is absent or there is a small amount of it. At a puncture of the left department of the heart, air bubbles come to light. Third, it is venous blood stasis in the small circulation and, as a consequence, venous hypertension, resulting in the ejection of erythrocytes into the thoracic lymphatic duct.

At the forensic examination of corpses with the reflex type of drowning, there are no signs of drowning and changes in the blood, it is possible only to detect concomitant diseases of the cardiovascular and respiratory systems.

A mixed type of drowning occurs in an average of 35% of observations and is characterized by polymorphism of the identified features characteristic of different types of drowning.

In general, such signs as swelling of the conjunctival folds, 'goosebumps', edema of the liver, bed, and walls of the gallbladder and hepatoduodenal folds (sign Shkaravsky-Rusakov), transudate in the serous cavities (sign Moro), maceration of the skin, wrinkles of the scrotum and nipples, hair loss, are among the signs of the corpse in the water, which can not be combined with signs of drowning.

Microscopic changes

Histological examination of lung tissue reveals foci of emphysematous dilatation and edema. In the area of swelling, the alveoli are dilated, the interalveolar septa are thin in places until ruptures. In the foci of edema, the picture is the opposite: the capillaries are full-blooded and dilated, the alveoli are normal in size and filled with a pink mass containing squamous epithelium and erythrocytes. It is also possible to detect foci of atelectasis of the lung tissue with areas of hemorrhage into the lung tissue. Exogenous particles in the form of impurities of bottom soil, aquatic vegetation, and plankton are rarely detected by microscopy. Vascular changes in the heart are characterized by spasm of the vessels of the interstitium, anemia of the capillaries of the epicardium. The intermediate tissue is swollen and fluffy, and in the thickness of the epicardium there are different foci of hemorrhage.

The following pathological-anatomic criteria or means of microscopic investigation in lung tissue in the case of death by drowning warrant mention (Dettmeyer, 2018):

- determining emphysema aquosum;

- detecting damage to the alveolar-capillary membrane;
- determining so-called pulmonary dysemia;
- alveolar macrophage count;
- detecting pigmented pulmonary macrophages in association with dust particles and crystals in left heart blood;
- histochemical typing of myelomonocytes in lung tissue;
- determining pulmonary surfactant;
- scanning electron microscopic investigation of lung tissue.

Histological changes during drowning lose their diagnostic value with the development of autolytic and putrefactive changes.

The stain haematoxylin and eosin (H&E) is most often used for staining specimen in case of drowning. Gomori staining and frozen sections using Sudan III (fat staining) are also recommended as routine staining methods (Dettmeyer, 2018).

Diatom test

The sectional picture in cases of drowning can be unconvincing, so the results of special laboratory tests are used to substantiate the diagnosis of drowning. Diatom plankton is most often used to diagnose death by drowning (Xu et al., 2011). The diatom test is currently the ‘gold standard’ for drowning diagnosis. Diatom tests are routinely made only in one academic forensic medicine units in Poland (Warsaw) and occasionally in 2 other centers, upon explicit request of the client (Department of Forensic Medicine in Bydgoszcz, Institute of Forensic Research in Kraków¹; Teresiński, 2016).

The presence of diatoms in the shell, which consists of hydrate of silicon oxide, distinguishes them from other types of algae. Silicon shell is not prone to decay, acids, and high temperatures.

The diatom test is based on the detection of diatomic plankton present in any aquatic environment. In the case of drowning, plankton during inhalation penetrates the air barrier and is carried with the blood-stream to the internal organs and tissues.

It is known that the length and width of diatoms that penetrate the tissues of the liver and kidneys are smaller than those found in lung tissues and water samples. Studies have found that *Pennatae* diatoms more easily cross the alveolar-capillary barrier, move in the blood, and are finally deposited in liver and kidney tissues (Zhang et al., 2020).

At post-mortem submersion of a body in water diatomic plankton cannot get through an aerohematological barrier and accordingly will not be found in internal organs. The presence of diatomic plankton in the lungs is not a sign of drowning but is a sign of submersion in water (Figure 4).

Currently, the only additional method used by a forensic-medical expert is the detection of diatomic plankton in the tissues of isolated kidneys by light optical microscopy. To determine diatoms from the corpses of people who died from drowning, one must send an uncut kidney, as this prevents diatomic plankton from entering the outside. The next step is to prepare the mineralizate from the kidney tissue using concentrated sulfuric and nitric acids. The precipitate of the obtained mineralizate is placed on a glass slide and microscopy is performed in directly transmitted light. The presence of 20–30 diatoms will indicate drowning.

Diatoms are a group of algae that have been actively studied for the last 200 years and have been used in forensic practice for 100 years. The algae species is more than 20,000 species in fresh, seawater, and wetlands. Diatoms are unicellular microorganisms with sizes from 4 to 2000 microns which are widespread in reservoirs. It is known that each reservoir has a certain set of species of diatomic plankton, which do not change over time. The qualitative and quantitative content of diatomic plankton depends on the type of reservoir – whether it is a pond with standing water or a pond with running water. Diatoms multiply intensively in water bodies, especially in spring and autumn. The peak falls at the end of March, April, and the end of August, September (Cai et al., 2016). This is the basis for the possibility of using diatomic plankton to establish the place of drowning (Krstic et al., 2002).

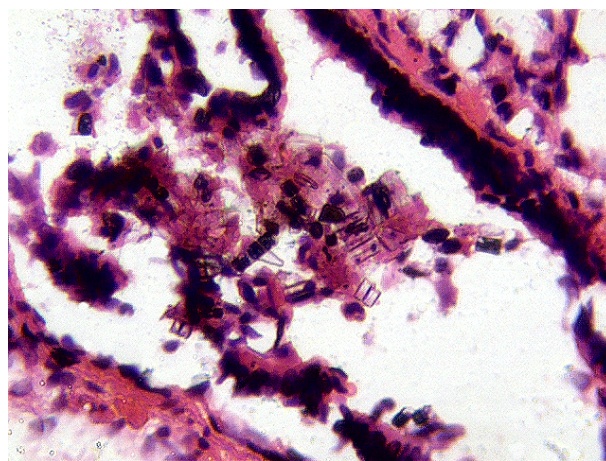


Figure 4. Diatomic plankton in the lungs tissue.

¹ Ed. n.: Currently, diatom tests are not carried out at the Institute of Forensic Research in Kraków.

The diatom test is considered a useful aid in determining the site of death from drowning. Nevertheless, there is disagreement within the scientific community concerning its reliability, and its findings have been challenged and sometimes overturned in courts of law. Using a model based on animal experimentation developed a diatom test to discriminate between the locations of drowning sites from different aquatic systems. This approach allowed us to validate the usefulness of the diatom test in determining the location of the drowning site (Carvalho et al., 2019).

Diatomological Maps (D-Map) for every water body can be created for a better diagnosis of the drowning site. Each D-Map will provide significant information not only regarding the commonly occurring, seasonal, rarely occurring, and site-specific diatoms but also gives qualitative and quantitative distributions of diatoms in different seasons in a particular water body (Thakar, Singh, 2010). Other authors who have studied tissue samples from drowning in the Duoro estuary (Portugal) have found a strong correlation between diatoms found in biological samples and those found in water samples from the relevant drowning site (Coelho, Ramos, Ribeiro, Marques, Santos, 2016). To improve the diagnosis of drowning sites, the authors justify the importance of creating a diatom base of potential drowning sites (eg. rivers, seas, lakes). It is also pointed out that in cases of drowning, water sampling from the place of drowning is crucial. This is the only way to allow a rigorous comparison of the diatom species in water and biological samples.

The analysis of the frequency of detection of diatoms in the organs of people who have died from drowning shows a tendency to reduce the frequency of their detection in recent years. This phenomenon may be due to the method of destruction of the material intended for research, through the use of concentrated acids to destroy organs, which sometimes eliminates the possibility of detecting diatomic plankton (Tie et al., 2010).

In some cases, the presence of diatoms during drowning is so small that it is impossible to detect them by microscopy. For example, picoplankton cannot be morphologically differentiated from protobacteria or bacilli (Kakizaki, Sonoda, Shinkawa, Yukawa, 2019).

In order to increase the efficiency and to eliminate the shortcomings of the method of classical diatom analysis, a number of methods were proposed, which, according to the authors, eliminated these shortcomings.

There is a constant debate in the scientific community about the reliability of the diatoms test during drowning. There are even several cases where the

expert's findings obtained using the diatoms test have been challenged and sometimes overturned in court (Carballeira, 2018) found the presence of diatomic plankton in samples obtained from persons who did not die from drowning. However, quantitative studies of plankton content have shown that there are statistical differences in the number of diatoms in false-positive cases and true cases of drowning. The authors recommend using a comprehensive analysis using more organs to confirm the results of drowning (Jian et al., 2019).

Kakizaki et al. offer a simple, fast, and safe protocol using inexpensive reagents such as papain, SDS, and 5 N HCl for extracting diatoms from lung, kidney, and liver tissues. Papain dissolved all organs well enough and allowed clear visualization of diatoms, although papain's solubilization activity was still inferior to strong acid digestion. This method can be used where there are limitations in budget, equipment, training (Kakizaki et al., 2019). To eliminate the effects of the use of concentrated acids, they can be used to prepare proteinase K drugs (Ludes, Quantin, Coste, Mangin, 1994). The authors proved the same effectiveness of this technique as when using concentrated sulfuric and nitric acids. To take advantage of the strong acid digestion method and the enzymic digestion method, a technique combining the two methods has been proposed (Yao, Kan, 2017). It has the characters of operation safety with little pollution to the environment, which is worthy of further popularization and practice. The method of diatom plankton isolation by tissue demineralization using hydrogen peroxide digestion has also proved itself well (Fucci et al., 2015). Hydrogen peroxide (H₂O₂) digestion resulted in less chemically hazardous to the laboratory operator and supports better diatom preservation for reliable taxonomic analysis.

Microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy (MD-VF-Auto SEM) method was developed. It is a new qualitative and quantitative method of diatom test for diagnosis of drowning. The new method is based on microwave digestion technique, vacuum filtration, and automated SEM, which would achieve maximum recovery of diatoms and identify diatoms easily by SEM with high resolution (Zhao, Liu, Hu, He, Lu, 2013). The study compared the efficiency and accuracy of the method (MD-VF-Auto SEM) in comparison with traditional methods of isolating diatoms using acids. The new technique showed statistically higher diagnostic results. This technique can significantly speed up the production of qualitative and quantitative data on the

formation of diatoms maps of rivers and lakes (Zhang et al., 2020).

A method based on artificial intelligence (AI) has been proposed for automatic detection of diatoms in combination with the classical approach to the study of diatoms. The method of teaching convolutional neural network (CNN) models on thousands or tens of thousands of tiles from digital whole-slide images of diatom smears is used. The results showed that the trained model helps to automatically calculate the qualitative and quantitative composition of diatoms in specimens prepared using traditional methods (Zhou et al., 2019).

Another study examined the effectiveness of using an artificial intelligence system compared to the work of forensic-medical experts in terms of detecting and recognizing different species of diatoms. The artificial intelligence system was pre-trained to recognize different types of diatomic plankton. As it turned out, the speed of the artificial intelligence system is higher than the work of forensic-medical experts. This study paves the way for future intelligent diatom tests in automatic mode (Zhou et al., 2020).

The qualitative and quantitative composition of diatoms is currently usually evaluated by light microscopy. This approach is common, but it has some limitations because it is subject to subjectivity in the classification of phenotype samples and also requires expert taxonomic knowledge. Zimmermann proposes the development of an alternative and more objective system for the identification of diatoms and the assessment of the structure of the diatoms for analysis using a DNA sequence-based approach (Zimmermann, Jahn, Gemeinholzer, 2011). The presented alternative – the so-called ecological barcoding of DNA – uses a short but taxon-specific DNA fragment to uniquely identify diatoms from water samples.

The presence of diatoms in the victim's internal organs has been regarded as gold biological evidence of drowning. The idea becomes true at the advent of DNA metabarcoding. Unfortunately, the DNA barcode of diatoms is far from being applicable due to neither consensus on the barcode and nor reliable reference library (Liu et al., 2020).

Laboratory (ancillary) research methods

Because diatomic plankton testing is the most important method of establishing drowning, other instrumental research methods have become less common. In recent years many instrumental research methods have been developed and implemented to correctly confirm the diagnosis of drowning.

One of the instrumental methods of establishing drowning is the method of postmortem computed tomography (Tse et al., 2018). After conducting a series of experiments using CT images of lungs, the authors found that drowning increases lung volume and found a characteristic ground-glass opacity (diffuse and uniform density increase) compared with the control group (Jian et al., 2019). Using the method of post-mortem CT difference in sinus fluid volume and density between saltwater and freshwater drowning. It was found that the sinus fluid density of saltwater drowning is significantly higher than freshwater drowning (Kawasumi et al., 2016).

However, it is necessary to note several scientific works performed using various methods. In particular, Maeda et al. proposed to weigh the organs during drowning and use biochemical parameters of some trace elements. The biochemical markers used in this study were urea nitrogen (UN), sodium (Na), chloride (Cl), calcium (Ca), and magnesium (Mg) in the blood and pericardial fluid. The authors established patterns in the ratio of trace elements in the blood, pericardial fluid, and lung mass, which can be successfully used to establish drowning (Maeda et al., 2009). Other authors have proposed to determine the content of three ions indices: sodium ion (Na^+), the summation of sodium and potassium ions ($\text{SUMNa} + \text{K}$), and summation of sodium, potassium, and chloride ions ($\text{SUMNa} + \text{K} + \text{Cl}$) in sphenoidal fluid (Yajima et al., 2018). This helped the authors to establish drowning, as well as to determine whether drowning occurred in the sea or freshwater. In drowning cases, sphenoidal fluid volume and time since death was not correlated, which suggests that water does not enter the sphenoidal sinuses after death and there is a different process for water accumulation in drowning and non-drowning cases.

Paulis and Hasan developed and proposed an experimental method for determining drowning in salt and fresh water based on biochemical analysis of cerebrospinal fluid in rabbits (Paulis, Hasan, 2018). They found that cerebrospinal fluid electrolytes except for potassium levels were significantly higher in rabbits drowned consciously in saltwater than their level in the control group. In rabbit drowned in freshwater, the examined electrolytes decreased significantly. Also, urea, creatinine, uric acid, glucose, and tumor necrosis factor were different in cases of freshwater and saltwater drowning from those of control rabbits.

Garland et al. report successful use of biochemical analysis of cerebrospinal fluid in case of diagnosis of death by drowning (Garland, Philcox et al., 2019; Garland, McCarthy et al., 2019). They report about

a saltwater drowning death from presumed suicide in which the postmortem cerebrospinal fluid sodium and chloride level was elevated compared with non-submersion deaths. This case provides evidence to support the potential use of postmortem cerebrospinal fluid sodium and chloride level as an adjunct to the diagnosis of saltwater drowning. Cerebrospinal fluid biochemical analysis, which is unaffected by immersion, may be an alternative method of drowning determining.

One of the morphological methods for diagnosing drowning developed in recent decades is the method of immunohistochemistry, which is based on the determination of proteins (antigens) in biological tissue cells based on the antigen-antibody reaction (Ramos-Vara, 2005).

A method of immunohistochemical study of pulmonary surfactant-associated protein A (SP-A), the increase of which is a marker in the diagnosis of drowning (Stemberga, Stifter, Cuculić, Coklo, Bosnar, 2009; Lee et al., 2017).

The point of this investigation was to examine aspiratory tissue responses in death by suffocating. Specifically, we concentrated on the immunohistochemical articulation of P-selectin, SP-A, HSP70, AQP-5, and fibronectin to explore our appearance in suffocating and to comprehend whether there are contrasts between saltwater suffocating drowning (SWD) and freshwater suffocating drowning (FWD), which may demonstrate alternate pathophysiology (Barranco, Castiglioni, Ventura, Fracasso, 2019).

The results of immunohistochemistry showed that the protein expression of aquaporin-1 (AQP-1) and AQP-4 of the drowning group were higher than the post-mortem submersion (Zhao, Yao, Hao, 2016). The increase in mRNA and protein expressions of AQP-1 and AQP-4 in the lungs of rats with acute lung injury of the drowning group would be useful for differentiating vital drowning from post-mortem submersion.

To diagnose drowning, the detection of chlorophyll of planktons in the lung sample with a spectrofluorophotometer (SFPM) is proposed (Jianping, Enshou, 1992).

The proposed methods have a number of disadvantages. Some methods, such as biochemical studies, cannot be used due to the development of autolytic and putrefactive changes. Some techniques are difficult to reproduce in the conditions of forensic institutions. Therefore, the search for effective methods for diagnosing drowning is relevant and promising.

Discussion

The diagnosis of drowning as a cause of death remains an important issue in modern forensic practice. An important task is to establish the fact of drowning as well as to determine the signs of submersion. Moreover, the diagnosis of drowning is a difficult feature in the case of so-called death in water, when death occurs from various diseases.

Macroscopic and microscopic signs of drowning are non-specific and, in addition, the process of decomposition, these signs are quickly destroyed. Sometimes signs of drowning are present, sometimes absent, and sometimes unrelated to the drowning process.

In most cases, autolytic and putrefactive changes will not allow to scientifically substantiate the diagnosis of drowning. Putrefactive changes should encourage scientists to further search for laboratory methods for diagnosing drowning. These new methods will help to reduce to a minimum probable errors of the expressed putrefactive changes but still do not help to diagnose drowning.

The proposed laboratory methods have disadvantages that limit the prospects of their application in practice. Many of the proposed methods have only a narrow application, which does not allow the use of equipment and facilities to solve other forensic problems. The vast majority of laboratory methods for diagnosing drowning are time consuming and require specially trained staff. Also, the results of many methods do not always meet the requirements of evidence-based medicine.

Diatom examinations are widely used to diagnose drowning in forensic-medical practice. However, methods of recognizing diatoms that use light or electron microscopy are time-consuming and often lead to erroneous positive or negative decisions (Zhou et al., 2019).

In recent years, scientists have been busy searching for effective and reliable methods for diagnosing drowning, which is based on the principles of evidence-based medicine (Barranco et al., 2019).

One of such method is the method of molecular genetic analysis using polymerase chain reaction (PCR). The PCR method is based on the determination of the nucleic acid sequence of DNA and allows the identification of species-specific genes using complementary primers.

Sensitive and specific PCR methods using DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) to identify 16S rDNA of plankton that exists everywhere in all water types are currently being developed and implemented (He, Huang, Liu, Shu, Yin, Li, 2008; He, Huang, Liu,

2008). To assess the usefulness of this method, the detection of 16S rDNA of plankton in drowned and submerged rabbits after death, as well as tissue samples obtained by dissecting the corpses of those who died from drowning. Plankton DNA was identified from the lung, liver, kidney, blood, and brain of the drowned victims, and the DGGE patterns helped indicate the site of drowning. The authors concluded that the new PCR-DGGE based method is a potentially useful tool for diagnosing drowning.

Identifying diatoms using morphological methods beyond the genus level is difficult and requires expert knowledge. During the last years, a new concept of DNA barcode is becoming a promising approach to identify the tax of diatoms (Li et al., 2019). In this study, the authors performed the diatomic morphological analysis of diatoms to the level of genus using an optical and electron microscope. They then designed and analyzed the 18S rDNA sequences as barcodes at the species level. This study established the morphological and DNA barcoding profile for the diatoms will be of great significance for the use of diatoms in the forensic-medical examination.

In the process of improving various PCR research methods, various authors propose to use these techniques to detect plankton in case of drowning. In particular, using real-time PCR with TaqMan, Uchiyama et al. developed nine pairs of primers to detect freshwater or marine bacterioplankton (Uchiyama et al., 2012). PCR examines for bacterioplankton were quick, less relentless, and high throughput just as delicate and explicit.

Using molecular approaches, most recently real-time polymerase chain reaction (PCR) assays with TaqMan probes for bacterioplankton, it is possible to undertake rapid, less laborious, high throughput tests to differentiate freshwater from marine bacterioplankton and in doing so provide a molecular diagnostic test to assist in the diagnosis of drowning (Rutty et al., 2015).

To establish drowning in freshwater, the method of amplifying garb and 16S rRNA genes of *Aeromonas hydrophilia* using PCR coupled with capillary electrophoresis is proposed (Mai, Xu, Liu, Zhao, Han, 2016).

The presence of phytoplankton DNA detected by the method of polymerase chain reaction in tissues during drowning is almost the only reliable method for diagnosing drowning (Rácz et al., 2016; Aoyagi et al., 2006; Seo, Ichida, Sato, Kuroki, Kishida, 2014).

The method of diagnosis using polymerase chain reaction was more reliable, sensitive, specific, and fast compared to the diagnosis of diatomic plankton using concentrated acids (Han, Wang, Li, Fan, Feng, 2013).

One of the advantages of using the PCR method is that molecular genetic research, as a rule, requires a very small volume of tissue (1–3 mm³; Schander, Hagnell, 2003).

Samples of internal organs for bacterioplankton PCR analysis for drowning can be obtained using coaxial cutting needle biopsy, guided by post-mortem computed tomography (PMCT), even without an autopsy (Rutty et al., 2017). The authors compared the PCR test results for plankton detection obtained by autopsy and the use of a minimally invasive method using a biopsy needle. The method has proven itself well, especially in cases where it is not possible to autopsy the corpse. When such a system is used, the operator must take all precautions to avoid contamination of the core biopsy samples due to the sensitivity of PCR-based analytical systems.

Authors report for the first time the use of coaxial cutting needle biopsy, guided by post-mortem computed tomography, to sample internal body tissues for bacterioplankton PCR analysis to investigate drowning. This technical report describes the biopsy technique, the comparison of the needle biopsy and the invasive autopsy sampling results, as well as the PMCT and autopsy findings. By using this new biopsy sampling approach for bacterioplankton PCR they developed on previous papers describing the minimally invasive PMCT approach for the diagnosis of drowning. When such a system is used, the operator must take all precautions to avoid contamination of the core biopsy samples due to the sensitivity of PCR-based analytical systems.

Phytoplankton exists in all types of reservoirs. One of the species of phytoplankton is represented by cyanobacteria. Cyanobacteria are among the most primitive existing plants containing chlorophyll and are considered one of the first photosynthetic organisms on the planet (Gault, Marler, 2009).

Many species of cyanobacteria produce microcystins, heptapeptides that are involved in animal poisoning around the world and are associated with human health problems. They are regarded as the most frequently occurring and widespread of the cyanotoxins, with more than 100 microcystins variants (Bouhaddada, Nélieu, Nasri, Delarue, Bouaïcha, 2016).

Microcystis aeruginosa is the most common species of cyanobacteria among all phytoplankton (Nasri, Delarue, Bouhaddada, 2016). These are the simplest unicellular algae that do not have nuclei and mitochondria. Spherical and cluster-shaped microscopic colonies develop in freshwater with stagnant and slow-flowing water. *Microcystis aeruginosa* causes the formation of so-called ‘water blooms’ and the death

of fish, animals, and have been involved in human health problems (Bouhaddada et al., 2016). Because cyanobacteria are small in size (0.2 to 2.0 microns), they can enter the internal organs of people who have died from drowning (Uchigasaki et al., 2016; Voloshynovych, Kasala, Stambul'ska, Voloshynovych, 2019). Detection of phytoplankton in closed organs is an important marker for the diagnosis of death in case of drowning (Aoyagi et al., 2009; Abe et al., 2003). The presence of phytoplankton in tissues can be detected even with significant cadaveric changes (Jianping, Enshou, 1992).

The use of the polymerase chain reaction method makes it possible to detect phytoplankton, which cannot be detected by traditional diagnostic methods using optical microscopy.

Also, the PCR method has several advantages over traditional methods of diagnosing drowning, namely:

1. High sensitivity in the detection of phytoplankton allows to determine the drowning using the minimum amount of material for research and the minimum amount of cyanobacteria or diatomic plankton in comparison with traditional methods.
2. High speed of the obtained results. The study takes less time than traditional methods (Rutty et al., 2015).
3. The use of the PCR method in comparison with traditional methods, is safer for the health of staff (when processing the material in the molecular genetic study does not use concentrated acids; Idota et al., 2017).

Conclusions

Successful application of the polymerase chain reaction method helps to determine the cause of death with a high degree of reliability of the results, which is especially important in the light of scientific and evidence-based medicine.

Thus, given the listed theoretical and practical problems of forensic diagnosis of asphyxia due to drowning at the present stage of development of science, it is understandable interest in conducting practical research on this topic.

Macroscopic and microscopic signs of drowning are not-specific, they can be present, or absent or unrelated to the drowning process, and the process of decomposition destroy them. That is why it is necessary to use criteria based on evidence-based medicine.

Laboratory research methods are often based on techniques that do not allow to reproduce their results in a forensic laboratory. And the results obtained

cannot be considered as evidence obtained in many cases.

Nowadays there has been a lack of research in the field of forensic medicine related to the use of evidence-based medicine, especially in the field of drowning.

The main evidence based method of diagnosing drowning at present is the detection of diatomic plankton in the tissues of isolated kidneys by light optical microscopy. However, microscopic examination and identification of diatomic plankton require a lot of time and accurate taxonomic examination. Also, a disadvantage of this method is the use of concentrated acids for the destruction of organs, which greatly complicates and sometimes eliminates the possibility of detection of diatomic plankton. The detection of other types of phytoplankton in kidney mineralizes is interpreted as pseudoplankton and has no diagnostic value.

The presence of diatomic plankton is currently the main evidence based method of diagnosing drowning. Analysis of the frequency of detection of diatoms in the organs of people who died as a result of drowning shows a tendency to reduce the frequency of their detection in recent years. This phenomenon may be due to the method of destruction of the material to be studied, through the use of concentrated acids to destroy organs, which sometimes eliminates the possibility of detecting diatoms. In some cases, the presence of diatoms during drowning is so small that they can not be detected by microscopy. In such cases, the presence of photoplankton DNA detected by PCR in tissues during drowning is almost the only method for diagnosing drowning. Given all the use of the PCR method is more promising than other laboratory methods for diagnosing of drowning.

The current state of forensic diagnosis of asphyxia due to drowning creates a risk of expert error. Especially the question of the diagnosis of drowning is a combined injury or insufficient expression of the classic signs of asphyxia due to drowning. To prevent errors, it is necessary to find additional and effective criteria that are based on evidence-based medicine and are effective and reliable in determining the cause of death.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

1. Abe, S., Suto, M., Nakamura, H., Gunji, H., Hiraiwa, K., Suzuki, T., Itoh, T., Kochi, H., Hoshiai, G.-I. (2003). A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning. *Medicine, Science and the Law*, 43(1), 23–30. DOI: <https://doi.org/10.1258/rsmmsl.43.1.23>.
2. Alsaif, D. M., Almadani, O. M., Ali Almoghannam, S., Hamdi, D., Al-Farayedhi, M. A., Kharosha, M. A. (2018). Child fatalities in Dammam: A call for child fatality reviews in Arab countries. *Journal of Forensic Sciences*, 63(4), 1171–1175. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13685>.
3. Aoyagi, M., Iwadate, K., Fukui, K., Abe, S., Sakai, K., Maebashi, K., Ochiai, E., Nakamura, M. (2009). A novel method for the diagnosis of drowning by detection of *Aeromonas sobria* with PCR method. *Legal Medicine*, 11(6), 257–259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.07.003>.
4. Aoyagi, M., Iwadate, K., Matsuyama, N., Nara, A., Shimada, R., Ito, Y. (2006). An applied diagnosis of drowning by detection of the aquatic bacterium with the PCR method: A case report. *Acta Criminologicae et Medicinae Legalis Japonica*, 72(2), 49–53. Retrieved October 13, 2021 from: https://www.researchgate.net/publication/287733875_An_applied_diagnosis_of_drowning_by_detection_of_the_aquatic_bacterium_with_the_PCR_method_A_case_report.
5. Bain, E., Keller, A. E., Jordan, H., Robyn, W., Pollanen, M. S., Williams, A. S., Donner, E. J. (2018). Drowning in epilepsy: A population-based case series. *Epilepsy Research*, 145, 123–126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2018.06.010>.
6. Barranco, R., Castiglioni, C., Ventura, F., Fracasso, T. (2019). Immunohistochemical expression of P-selectin, SP-A, HSP70, aquaporin 5, and fibronectin in saltwater drowning and freshwater drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 133(5), 1461–1467. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02105-1>.
7. Bierens, J. J. L. M., Lunetta, P., Tipton, M., Warner, D. S. (2016). Physiology of drowning: A review. *Physiology*, 31(2), 147–166. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2015>.
8. Bouhaddada, R., Néliu, S., Nasri, H., Delarue, G., Bouaïcha, N. (2016). High diversity of microcystins in a *Microcystis* bloom from an Algerian lake. *Environmental Pollution*, 216, 836–844. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.055>.
9. Cai, H. G., Ying, J., Ni, Z. H., Lan, P., Zhang, Y. Y., Yu, R. J., Pang, H. B., Ye, C. L., Wei, D. M. (2016). Diatoms distribution in Ningbo three-river watershed during summer. *Fa Yi Xue Za Zhi (Journal of Forensic Medicine)*, 32(6), 413–414. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-5619.2016.06.004>.
10. Carballeira, R., Vieira, D. N., Febrero-Bande, M., Muñoz Barús, J. I. (2018). A valid method to determine the site of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 132(2), 487–497. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1708-1>.
11. Carvalho, R. C., Kennedy, D. M., Woodroffe, C. D. (2019). A morphology-based drowning risk index for rock platform fishing: A case study from southeastern Australia. *Nat Hazards*, 96, 837–856. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11069-019-03572-w>.
12. Coelho, S., Ramos, P., Ribeiro, C., Marques, J., Santos, A. (2016). Contribution to the determination of the place of death by drowning – A study of diatoms' biodiversity in Douro river estuary. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 41, 58–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.04.007>.
13. Dettmeyer, R. B. (2018). *Forensic histopathology. Fundamentals and perspectives*. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77997-3>.
14. Ferrara, S. D., Baccino, E., Bajanowski, T., Boscolo-Berto, R., Castellano, M., De Angel, R., Pauliukevičius, A., Ricci, P., Vanezis, P., Vieira, D. N., Viel, G., Villanueva, E. (2013). Malpractice and medical liability. European guidelines on methods of ascertainment and criteria of evaluation. *International Journal of Legal Medicine*, 127(3), 545–557. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0836-5>.
15. Fucci, N., Pascali, V. L., Puccinelli, C., Marcheggiani, S., Mancini, L., Marchetti, D. (2015). Evaluation of two methods for the use of diatoms in drowning cases. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 11(4), 601–605. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12024-015-9708-2>.
16. Garland, J., McCarthy, S., Hensby-Bennett, S., Philcox, W., O'Regan, T., Rousseau, G., Palmiere, C., Elstubb, H., Cala, A., Clifton, L., Lam, L., Barker, C., Ondruschka, B., Woydt, L., Spark, A., Kesha, K., Morrow, P., Glenn, C., Stables, S., Tse, R. (2019). Elevation of postmortem cerebrospinal fluid sodium and chloride levels is a potential adjunct test in the diagnosis of salt water drowning. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 40(3), 251–257. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000488>.
17. Garland, J., Philcox, W., Kesha, K., McCarthy, S., Lam, L. C. S., Palmiere, C., Hensby-Bennett, S., Stables, S., Tse, R. (2019). Elevated cerebrospinal fluid sodium and chloride levels in a saltwater drowning death. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 40(3), 258–261. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000464>.
18. Gault, P. M., Marler, H. J. (Eds.). (2009). *Handbook on cyanobacteria: Biochemistry, biotechnology and applications*. Nova Science Publishers.

19. Gotsmy, W., Lombardo, P., Jackowski, C., Brenciova, E., Zech, W-D. (2019). Layering of stomach contents in drowning cases in post-mortem computed tomography compared to forensic autopsy. *International Journal of Legal Medicine*, 133(1), 181–188. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1850-4>.
20. Han, J., Wang, C., Li, X., Fan, Y., Feng, X. (2013). Comparative analysis between diatom nitric acid digestion method and plankton 16S rDNA PCR method. *Fa Yi Xue Za Zhi (Journal of Forensic Medicine)*, 29(5), 356–359. Retrieved December 19, 2021 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24466776/>.
21. He, F., Huang, D., Liu, L. (2008). A PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 23(4), 234–237. Retrieved January 15, 2022 from: https://www.researchgate.net/publication/288818800_A_PCR-DGGE-based_method_for_identifying_plankton_16S_rDNA_for_the_diagnosis_of_drowning.
22. He, F., Huang, D., Liu, L., Shu, X., Yin, H., Li, X. (2008). A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Science International*, 176(2–3), 152–156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.08.005>.
23. Idota, N., Tsuboi, H., Takaso, M., Tojo, M., Kinebuchi, T., Nakamura, M., Ichioka, H., Shintani-Ishida, K., Ikegaya, H. (2017). Comparison between temperature gradient gel electrophoresis of bacterial 16S rDNA and diatom test for diagnosis of drowning. *Journal of Forensic Sciences*, 63(2–3), 1–6. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13606>.
24. Isaev, Y. S., Sveshnikov, V. (1988). *Forensic medical substantiation of death from drowning in water*. Retrieved August 16, 2021 from: <http://www.forens-med.ru/book.php?id=1421>.
25. Jian, J. Q., Deng, D. Y., Wan, L., Zou, D. H., Wang, Z. Q., Liu, N. G., Chen, Y. J. (2019). Characteristic changes and 3D virtual measurement of lung CT image parameters in the drowning rabbit model. *Fa Yi Xue Za Zhi (Journal of Forensic Medicine)*, 35(1), 1–4. DOI: <https://doi.org/10.12116/j.issn.1004-5619.2019.01.001>.
26. Jianping, Q., Enshou, W. (1992). A study on the diagnosis of drowning by examination of lung chlorophyll(a) of planktons with a spectrofluorophotometer. *Forensic Science International*, 53(2), 149–155. DOI: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90191-X](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90191-X).
27. Kakizaki, E., Sonoda, A., Shinkawa, N., Yukawa, N. (2019). A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain: Optimal digestion and first practical application. *Forensic Science International*, 297, 204–216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.008>.
28. Kanchan, T., Saraf, A., Ateriya, N. (2018). “Appearances are deceptive” – External foam as an indicator of post-mortem period. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 54, 8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.12.007>.
29. Kawasumi, Y., Kawabata, T., Sugai, Y., Usui, A., Hosokai, Y., Sato, M., Saito, H., Ishibashi, T., Hayashizaki, Y., Funayama, M. (2012). Assessment of the relationship between drowning and fluid accumulation in the paranasal sinuses on post-mortem computed tomography. *European Journal of Radiology*, 81(12), 3953–3955. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2012.08.011>.
30. Kawasumi, Y., Usui, A., Sato, Y., Sato, Y., Daigaku, N., Hosokai, Y., Hayashizaki, Y., Funayama, M., Ishibashi, T. (2016). Distinction between saltwater drowning and freshwater drowning by assessment of sinus fluid on post-mortem computed tomography. *European Radiology*, 26(4), 1186–1190. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00330-015-3909-7>.
31. Kevrekidis, D. P., Brousa, E., Mastrogianni, O., Orfanidis, A., Gika, H. G., Raikos, N. (2020). Risk factors for fatal drowning in a Greek region: A retrospective case-control study. *Injury Prevention: Journal of the International Society for Child and Adolescent Injury Prevention*, 27, 316–323. DOI: <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2020-043788>.
32. Krstic, S., Duma, A., Janevska, B., Levkov, Z., Nikolova, K., Noveska, M. (2002). Diatoms in forensic expertise of drowning – A Macedonian experience. *Forensic Science International*, 127(3), 198–203. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00125-1).
33. Lee, S.-Y., Woo, S.-K., Lee, S.-M., Ha, E.-J., Lim, K.-H., Choi, K.-H., Roh, Y.-H., Eom, Y.-B. (2017). Microbiota composition and pulmonary surfactant protein expression as markers of death by drowning. *Journal of Forensic Sciences*, 62(4), 1080–1088. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13347>.
34. Li, Z., Liu, X., Yu, Y., Huang, H., Li, X., Ji, Q., Li, K., Yu, Y., Li, D., Mao, Z., Pu, Y., Chen, P., Chen, F. (2019). Barcoding for diatoms in the Yangtze River from the morphological observation and 18S rDNA polymorphic analysis. *Forensic Science International*, 297, 81–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.01.028>.
35. Liu, M., Zhao, Y., Sun, Y., Wu, P., Zhou, S., Ren, L. (2020). Diatom DNA barcodes for forensic discrimination of drowning incidents. *FEMS Microbiology Letters*, 367(17). DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa145>.
36. Liu, Q.-P., Zhou, D.-X., Sun, L., Ling, L., Wu, C.-G., Lin, P., Han, S.-P. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorates seawater-exposure-induced acute lung injury by inhibiting autophagy in lung tissue. *Pathology Research International*, 104962. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/104962>.

37. Ludes, B., Quantin, S., Coste, M., Mangin, P. (1994). Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1), 37–41. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01247273>.
38. Maeda, H., Zhu, B. L., Ishikawa, T., Quan, L., Michiue, T., Bessho, Y., Okazaki, S., Kamikodai, Y., Tsuda, K., Komatsu, A., Azuma, Y. (2009). Analysis of postmortem biochemical findings with regard to the lung weight in drowning. *Legal Medicine*, 11(1), 269–272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.01.029>.
39. Mai, B.-S., Xu, Q.-Y., Liu, C., Zhao, J., Han, Y.-L. (2016). Diagnosis of drowning by detecting gyrB and 16S rRNA genes of *Aeromonas hydrophila* using PCR-capillary electrophoresis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao (Journal of Southern Medical University)*, 36(11), 1550–1554. Retrieved February 20, 2022 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27881349/>.
40. Main, A. B., Hooper, A. J. (2017). Drowning and immersion injury. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 18(8), 401–403. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpac.2017.05.006>.
41. Miyazato, T., Ishikawa, T., Michiue, T., Maeda, H. (2012). Molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines in drowning compared with other asphyxiation and fatal hypothermia. *International Journal of Legal Medicine*, 126(4), 581–587. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0698-2>.
42. Nasri, H., Delarue, G., Bouhaddada, R. (2016). High diversity of microcystins in a *Microcystis* bloom from an Algerian. *Environmental Pollution*, 216, 836–844. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.055>.
43. Oshima, T., Ohtani, M., Mimasaka, S. (2019). Muscular hemorrhages around the scapula resulting from excessive upper extremity motion in cases of fatal drowning: Autopsy findings for insights on manner of death. *Forensic Science International*, 300, 82–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.04.029>.
44. Paulis, M. G., Hasan, E. I. (2018). Electrolytes and biochemical changes in cerebrospinal fluid in drowning: Experimental rabbit model. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 39(3), 236–241. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000407>.
45. Pavlidis, P., Karakasi, M.-V. (2019). A retrospective statistical review of deaths owing to migration through the southeasternmost land borders of the European Union, Greece 2000–14. *Disasters*, 43(3), 459–477. DOI: <https://doi.org/10.1111/disa.12355>.
46. Piette, M. H. A., De Letter, E. A. (2006). Drowning: Still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Science International*, 163(1–2), 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.027>.
47. Preventing drowning: Practical guidance. *World Health Organization*. Retrieved May 28, 2022 from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240046726>.
48. Quan, L. (2003). Characteristics of drowning by different age groups. *Injury Prevention*, 9(2), 163–168. DOI: <https://doi.org/10.1136/ip.9.2.163>.
49. Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>.
50. Rácz, E., Könczöl, F., Tóth, D., Patonai, Z., Porpáczy, Z., Kozma, Z., Poór, V. S., Sipos, K. (2016). PCR-based identification of drowning: Four case reports. *International Journal of Legal Medicine*, 130(5), 1303–1307. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1359-7>.
51. Reijnen, G., Vos, P., Buster, M., Reijnders, U. (2019). Can pulmonary foam arise after postmortem submersion in water? An animal experimental pilot study. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 61, 40–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.11.004>.
52. Rutty, G. N., Bradley, C. J., Biggs, M. J. P., Hollingbury, F. E., Hamilton, S. J., Malcomson, R. D. G., Holmes, C. W. (2015). Detection of bacterioplankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning: the Leicester experience. *Legal Medicine*, 17(5), 401–408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.06.001>.
53. Rutty, G. N., Johnson, C., Amoroso, J., Robinson, C., Bradley, C. J., Morgan, B. (2017). Post-mortem computed tomography coaxial cutting needle biopsy to facilitate the detection of bacterioplankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 131(1), 211–216. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1473-6>.
54. Saini, E., Khanagwal, V. P., Singh, R. (2017). A systematic databasing of diatoms from different geographical localities and sites of Haryana for advancing validation of forensic diatomology. *Data in Brief*, 10, 63–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.072>.
55. Saunders, C. J., Adriaanse, R., Simons, A., van Niekerk, A. (2018). Fatal drowning in the Western Cape, South Africa: A 7-year retrospective, epidemiological study. *Injury Prevention: Journal of the International Society for Child and Adolescent Injury Prevention*, 25, 529–534. DOI: <https://doi.org/10.1136/injury-prev-2018-042945>.
56. Schander, C., Hagnell, J. (2003). Death by drowning degraded DNA. *Journal of Molluscan Studies*, 69, 387–388. DOI: <https://doi.org/10.1093/mollus/69.4.387>.
57. Schneppe, S., Dokter, M., Bockholdt, B. (2020). Macromorphological findings in cases of death in water: A critical view on “drowning signs”. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 281–291. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02469-9>.
58. Seo, Y., Ichida, D., Sato, S., Kuroki, K., Kishida, T. (2014). An improved method for the diatom test utilizing DNA binding ability of silica. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 779–784. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12390>.

59. Stemberga, V., Stifter, S., Cuculić, D., Coklo, M., Bosnar, A. (2009). Immunohistochemical surfactant protein-A expression: Fatal drowning vs. postmortem immersion. *Medical Hypotheses*, 72(4), 413–415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.11.024>.
60. Teresiński, G. (2016). Polska medycyna sądowa A.D. 2016 – raport konsultanta krajowego. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 66(4), 262–304. DOI: <https://doi.org/10.5114/amsik.2016.68101>.
61. Tester, D. J., Kopplin, L. J., Creighton, W., Burke, A. P., Ackerman, M. J. (2005). Pathogenesis of unexplained drowning: New insights from a molecular autopsy. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(5), 596–600. DOI: <https://doi.org/10.4065/80.5.596>.
62. Thakar, M. K., Singh, R. (2010). Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 17(1), 18–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2009.07.016>.
63. Tie, J., Uchigasaki, S., Haseba, T., Ohno, Y., Isahai, I., Oshida, S. (2010). Direct and rapid PCR amplification using digested tissues for the diagnosis of drowning. *Electrophoresis*, 31, 2411–2415. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200900754>.
64. Tse, R., Garland, J., Kesha, K., Morrow, P., Lam, L., Elstub, H., Cala, A., Spark, A., Palmiere, C., Stables, S. (2018). Combining postmortem vitreous sodium and chloride and lung-body ratio in aiding the diagnosing saltwater drowning. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 39(3), 229–235. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000410>.
65. Uchigasaki, S., Tie, J., Haseba, T., Cui, F., Ohno, Y., Isobe, E., Isahai, I., Tsutsumi, H. (2016). Real-time PCR assay for the detection of picoplankton DNA distribution in the tissues of drowned rabbits. *Legal Medicine*, 20, 33–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.03.005>.
66. Uchiyama, T., Kakizaki, E., Kozawa, S., Nishida, S., Imamura, N., Yukawa, N. (2012). A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: Simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Science International*, 222, 11–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.029>.
67. Voloshynovych, V. M., Kasala, R. O., Stambulska, U. Y., Voloshynovych, M. S. (2019). Determination the presence of amplification products of 16s rRNA microcystis aeruginosa as a biomarker of drowning. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 27(1), 16–21. DOI: <https://doi.org/10.4323/rjlm.2019.16>.
68. WHR/World Health Rankings. Retrieved June 28, 2022 from: <https://www.worldlifeexpectancy.com/ukraine-drownings>.
69. Xu, G., Hu, B., Shen, R., Pan, X., Zhou, X. (2011). Applications for drowning identification by planktonic diatom test on rats in forensic medicine. *Procedia Engineering*, 18, 417–421. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.067>.
70. Yajima, D., Inokuchi, G., Makino, Y., Motomura, A., Chiba, F., Torimitsu, S., Yamaguchi, R., Hoshioka, Y., Malakienė, D., Raudys, R., Iwase, H. (2018). Diagnosis of drowning by summation of sodium, potassium, and chloride ion levels in sphenoidal sinus fluid: Differentiating between freshwater and seawater drowning and its application to brackish water and bathtub deaths. *Forensic Science International*, 284, 219–225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.01.013>.
71. Yang, K., Choi, B. H., Lee, B., Yoo, S. H. (2018). Bath-related deaths in Korea between 2008–2015. *Journal of Korean Medical Science*, 33(14), e108. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e108>.
72. Yao, J., Kan, W. J. (2017). Diatom detection using enzyme combined with strong acid digestion method. *Fa Yi Xue Za Zhi (Journal of Forensic Medicine)*, 33(2), 165–167. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-5619.2017.02.012>.
73. Zhang, L., Nie, Q., Dai, Y., Zhu, S., Wang, J., Wang, W., Tan, X., Zhang, P., Li, J. (2020). Diatomological mapping of water bodies in Chongqing section of the Yangtze River and Jialing River. *International Journal of Legal Medicine*, 134(4), 1375–1385. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02297-x>.
74. Zhang, P., Kang, X., Zhang, S., Xiao, C., Ma, Y., Shi, H., Xu, Q., Zhao, J., Chen, L., Liu, C. (2020). The length and width of diatoms in drowning cases as the evidence of diatoms penetrating the alveoli-capillary barrier. *International Journal of Legal Medicine*, 134(3), 1037–1042. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02164-4>.
75. Zhao, B., Yao, S. Q., Hao, X. H. (2016). Expression of AQP-1 and AQP-4 in the Lungs of Drown Rats. *Fa Yi Xue Za Zhi (Journal of Forensic Medicine)*, 32(5), 321–325. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-5619.2016.05.001>.
76. Zhao, J., Liu, C., Hu, S., He, S., Lu, S. (2013). Microwave digestion – vacuum filtration-automated scanning electron microscopy as a sensitive method for forensic diatom test. *International Journal of Legal Medicine*, 127(2), 459–463. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0756-9>.
77. Zhou, Y., Cao, Y., Huang, J., Deng, K., Ma, K., Zhang, T., Chen, L., Zhang, J., Huang, P. (2020). Research advances in forensic diatom testing. *Forensic Sciences Research*, 5(2), 98–105. DOI: <https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1718901>.
78. Zhou, Y., Zhang, J., Huang, J., Deng, K., Zhang, J., Qin, Z., Wang, Z., Zhang, X., Tuo, Y., Chen, L., Chen, Y., Huang, P. (2019). Digital whole-slide image analysis for automated diatom test in forensic cases of drowning using a convolutional neural network algorithm. *Forensic Science International*, 302, 109922. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109922>.

79. Zimmermann, J., Jahn, R., Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>.

Corresponding author

Volodymyr M. Voloshynovych
Department of Forensic Medicine and Medical Law
Ivano-Frankivsk National Medical University of the
Ministry of Health of Ukraine
Galytska Str. 2
UA 76018 Ivano-Frankivsk
e-mail: voloshynovych@yahoo.com

OBECNY STAN I PERSPEKTYWY SĄDOWO-LEKARSKIEJ DIAGNOSTYKI UTONIĘĆ. PRZEGLĄD LITERATURY

Wstęp

Do asfiksji w wyniku utonięcia, jednego z typów śmierci gwałtownej, dochodzi w sytuacji zanurzenia człowieka w wodzie (rzadziej w innej cieczy) i towarzyszy jej ostra dysfunkcja ważnych dla życia układów organizmu. Ze względu na częste zgony w wyniku utonięcia, głównie wśród przebywających nad wodą młodych ludzi, jest to poważny problem społeczny (Tester, Kopplin, Creighton, Burke, Ackerman, 2005). W utonięciach czynnikami ryzyka są: nieodpowiedni nadzór nad dziećmi, rekreacyjny lub zawodowy dostęp do wody, ryzykowne zachowania oraz ogólny stan zdrowia (Main, Hooper, 2017). U osób chorych na padaczkę ryzyko utonięcia jest prawie dziesięciokrotnie wyższe niż średnia populacji ogólnej (1,5 na 10 000 osób w ciągu roku w porównaniu z szacowaną średnią regionu, w którym prowadzono badania – 0,13 na 10 000 osób (Bain i in., 2018). Śmierć w wyniku utonięcia u osób chorych na padaczkę najczęściej następuje w wannie.

Zgodnie z doniesieniami Światowej Organizacji Zdrowia (*WHO – World Health Organization*) każdego roku z powodu utonięcia umiera na świecie 230 000 osób, z czego ponad 90% przypadków odnotowuje się w krajach o niskich i średnich dochodach. Utonięcie stanowi około 1/3 wszystkich przypadków, w których doszło do asfiksji. Niektóre rodzaje działalności człowieka i terytorium, które zamieszkuje (Carvalho, Kennedy, Wodroffe, 2019), procesy migracyjne (Pavlidis, Karakasi, 2019), okresy świąteczne, np. dni wolne od pracy (Saunders, Adriaanse, Simons, Niekerk, 2018), mają wpływ na zwiększenie liczby przypadków utonięć. Płeć męska, starszy wiek, obce obywatelstwo i choroby układu krążenia to czynniki, które predysponowały osoby do zwiększonego ryzyka śmiertelnego zanurzenia (Kevrekidis i in., 2020; Quan, 2003; Alsaif i in., 2018).

Według najnowszych danych WHO opublikowanych w 2020 roku zgony z powodu utonięć w Ukrainie osiągnęły 2312, co stanowi 0,41% ogółu zgonów. Skorygowany współczynnik zgonów wynosi 4,69 na 100 000 mieszkańców, co plasuje Ukrainę na 31 miejscu na świecie (*WHR – World Health Rankings*). Współczynnik ten w krajach sąsiadujących z Ukrainą wynosi: 0,78 na Węgrzech, 1,39 w Polsce, 2,12 na Słowacji oraz 2,55 w Rumunii.

W niniejszej pracy dokonano krytycznej analizy literatury. Wnioski merytoryczne zawierają nowe, istotne z naukowego punktu widzenia fakty i zagadnienia dotyczące problemu sądowo-lekarskiej diagnostyki utonięć.

Diagnostyka sądowo-lekarska utonięć

Autopsja szczątków topielców od zawsze była i jest jednym z najtrudniejszych badań (Xu, Hu, Shen, Pan, Zhou, 2011).

Właściwa diagnostyka kryminalistyczna jest niezwykle ważna dla ustalenia przyczyny śmierci w wodzie – czy powodem były ostre stany patologiczne układu krążenia i oddechowego, urazy, czy też doszło do przypadku pośmiertnego zanurzenia zwłok w wodzie w celu ukrycia śladów przestępstwa. W takich sytuacjach najważniejszym zadaniem jest ustalenie faktu utonięcia, miejsca utonięcia (Saini, Khanagwal, Singh, 2017), a także odpowiedź na pytanie – czy osoba dostała się do zbiornika wodnego za życia, jakie były przyczyny jej śmierci oraz ustalenie innych faktów, które spowodowały utonięcie.

Diagnostyka utonięć jest logicznie podzielona ze względu na ich rodzaje. Według klasyfikacji Isajewa i Sveshnikova można wyróżnić cztery główne typy utonięcia w wodzie: aspiracyjny, spastyczny (asfiksyjny), odruchowy (omdleniowy) oraz typ mieszany (Isaev, Sveshnikov, 1988).

1. Typ aspiracyjny utonięcia charakteryzuje się przedostaniem się wody do dróg oddechowych i płuc z następowym rozwojem asfiksji w wyniku zamknięcia dróg oddechowych.

W przypadku utonięcia w wodzie słodkiej płyn przenika do małych pęcherzyków płucnych, a następnie, wskutek ciśnienia hydrostatycznego, dochodzi do ich pęknięcia. Woda dostaje się do ogólnego obiegu krwi, co powoduje jej rozrzedzenie (Piette, De Letter, 2006). Większość ofiar utonięcia umiera w sposób ostry z powodu zaburzeń równowagi elektrolitowej i migotania komór. Czas trwania tonięcia wynosi 3–5 minut. Po utonięciu w słonej (morskiej) wodzie płyn z krwiobiegu na skutek ciśnienia osmotycznego dostaje się do wnętrza pęcherzyków płucnych, powodując tym samym proces ostrego obrzęku płuc (Maeda i in., 2009). Zatrzymanie krążenia, z reguły w wyniku asystolii, rozwija się stopniowo w ciągu 7–8 minut, z narastającym niedotlenieniem mięśnia sercowego. Czynność serca ustaje po 10–20 sekundach od zatrzymania oddechu.

2. Typ spastyczny (asfiksyjny) utonięcia charakteryzuje się pojawieniem się uporczywego skurczu krtani w odpowiedzi na podrażnienie receptorów jej błony śluzowej przez środowisko utonięcia (wodę, ropę lub inną ciecz), co jednocześnie uruchamia mechanizm asfiksji z powodu niedrożności dróg oddechowych. Potwierdzony doświadczalnie skurcz trwa około 2 minut, po czym

zostaje zastąpiony przez inne mechanizmy patologiczne, takie jak wazowagalne zatrzymanie krążenia, które odruchowo pojawia się w momencie kontaktu płynu z górnymi drogami oddechowymi (Bierens, Lunetta, Tipton, Warner, 2016). Czas trwania tonięcia wynosi 5,5–12,5 minuty.

Zatrzymanie krążenia następuje na tle hipotensji tętnicznej w ciągu 20–40 sekund, później dochodzi do zatrzymania oddechu. Według różnych autorów typ spastyczny utonięcia występuje w 35–61% zgonów (Ferrara i in., 2013).

3. Typ odruchowy (omdleniowy) utonięcia charakteryzuje się nagłym ustaniem czynności oddechowej i sercowej. Ważną rolę odgrywa podłoże emocjonalne (uczucie lęku, paniki), a także obecność chorób współistniejących. Biorąc to pod uwagę, poprawniej byłoby mówić nie o utonięciu, ale o śmierci w wodzie. Typ odruchowy utonięcia występuje średnio w 5% przypadków i jest częstszy u dzieci i kobiet (Carballeira, Vieira, Ferrero-Bande, Muñoz Barús, 2018).

4. Mieszany typ utonięcia występuje średnio w 35% przypadków i charakteryzuje się polimorfizmem stwierdzonych objawów, co wiąże się z połączeniem różnych typów śmierci. Ten rodzaj utonięć najczęściej rozpoczyna się od skurczu krtani, po czym następują późniejsze fazy tonięcia. Woda dostaje się do górnych dróg oddechowych i płuc, gdzie dochodzi do rozwoju zjawisk właściwych dla aspiracyjnego typu utonięcia (Isaev, Sveshnikov, 1988).

Gdy zwłoki są znajdowane w wodzie, rozważa się dwie przyczyny śmierci: w pierwszym przypadku przyczyna zgonu nie była związana z bezpośrednim kontaktem z wodą, w drugim – śmierć nastąpiła w wyniku utonięcia. Pierwszy wariant obejmuje wszystkie przypadki pośmiertnego zanurzenia ciała w wodzie, charakteryzujące się jedynie tym, że na ciele pozostały ślady przebywania w środowisku wodnym. Obecność dodatkowego obciążenia przywiązanego do zwłok nie zawsze jest dowodem na przymusowe zanurzenie w wodzie. Może to być sposób na popełnienie samobójstwa lub pośmiertne ukrycie zwłok (Schnepppe, Dokter, Bockholdt, 2020). Liczne przypadki śmierci w wodzie z powodów takich jak ostre stany patologiczne układu krążenia i oddechowego, urazy, a także przypadki pośmiertnego zanurzenia ciał w wodzie w celu ukrycia śladów przestępstwa sprawiają, że rozpoznanie utonięcia staje się bardzo skomplikowane.

Okoliczności sugerujące zgon z powodu utonięcia to znajdowanie się zwłok w dużych zbiornikach wodnych, na ich brzegach czy w sztucznych zbiornikach z wodą lub w ich pobliżu. Głębokość zbiornika nie odgrywa decydującej roli, wystarczy zanurzyć głowę lub po prostu zablokować płynem drogi oddechowe. W takich przypadkach kluczowe znaczenie ma inercja ofiary (upojenie alkoholowe lub narkotykowe, stan nieprzytomności,

kalectwo itp.). Utonięciu mogą jednak ulec także osoby sprawne fizycznie oraz zawodowi pływacy, gdyż w sytuacji nagłego i niespodziewanego zanurzenia dochodzi do utraty możliwości wykorzystania umiejętności pływania.

Diagnoza utonięcia wiąże się z kompletną medyczą sądową sekcją zwłok połączoną z dokładnym badaniem miejsca zdarzenia i kompleksowym badaniem toksykologicznym oraz histologicznym w celu zebrania informacji o okolicznościach zdarzenia i o zmarłym.

W związku z tym rozpoznanie asfiksji spowodowanej utonięciem jest diagnozą wykluczenia, która jest ustalana poprzez odrzucenie innych przyczyn śmierci, a zatem zawsze istnieje możliwość błędnej diagnozy. Wykrycie oznak śmierci przeczących utonięciu pomaga w ustaleniu przyczyny zgonu, ale pozostaje pytanie o przedśmiertne wejście poddawanej autopsji osoby do środowiska wodnego i o to, jaki był jego wpływ na rozwój bezpośredniej przyczyny zgonu. Opisano już liczne wewnętrzne i zewnętrzne objawy utonięcia, pozwalające na stwierdzenie, że śmierć nastąpiła z jego przyczyny. Należy się jednak spodziewać, że będą one podlegać wpływom innych czynników, które zmniejszają ich znaczenie i wartość dowodową (Schnepppe i in., 2020). Diagnostyka utonięcia wiąże się z zaobserwowaniem zestawu niespecyficznych objawów, z których nie każdy stanowi jednoznaczne potwierdzenie rozpoznania.

Zmiany makroskopowe

Ogłędziny rozpoczyna się od sprawdzenia odzieży, która w większości przypadków jest mokra, ze śladami piasku lub roślin wodnych (glonów). Skóra jest zwykle blada, zwłoki są zimne w dotyku, na powierzchniach dłoniowych i podeszwowych skóry widoczna jest maceracja – tzw. „ręce praczki” (Ryc. 1) i „stopy praczki” (Ryc. 2).

Połączenie tych cech w takiej lub innej kombinacji jest wspólne dla wszystkich rodzajów utonięć, a także pośmiertnego zanurzenia ciała w wodzie; najczęściej wskazuje ono jedynie na obecność zwłok w wodzie, zwłaszcza zimnej. Najcenniejszą wskazówką jest stabilna drobnopęcherzykowa piana obecna w okolicach ust i nozdrzy (Ryc. 3; Kanchan, Saraf, Ateriya, 2018). Badania dowodzą, że piana wokół ust i nosa nie może się tworzyć z powodu przebywania ciała w wodzie. Obecność piany stwierdzano także w przypadkach utonięcia zwierząt doświadczalnych (Reijnen, Vos, Buster, Reijnders, 2019), jednak do powstawania piany może również dochodzić w przypadku wstrząsu kardiogenego, obrzęku płuc, padaczki, zatrucia lub porażenia prądem.

Obecność ogólnych objawów asfiksji wykrywanych podczas badania wewnętrznego jest charakterystyczna dla wszystkich rodzajów utonięć. Do takich objawów należy ciemna płynna krew, przepełnienie krwią prawej połowy serca, sinoczerwone zabarwienie narządów wewnętrznych, niedokrwiłość śledziony, krwotok

podopłucnowy i podnasilczowy (Bierens i in., 2016), krwotok podspojówkowy, krwotok pod twardówką oczu, sinica twarzy, mimowolne oddawanie moczu, akt defekacji, wytrysk, upławy z korka śluzowego szyjki macicy u kobiet. Charakter plam pośmiertnych może być różny: od intensywnie rozlanych (w typie asfiksyjnym utonięcia) do jasnoróżowych (w typie aspiracyjnym utonięcia, na skutek rozcieńczenia krwi wodą).

Badanie wewnętrzne ujawnia w żołądku środowisko, w którym doszło do utonięcia, z charakterystyczną domieszką piasku, mułu i glonów (objaw Fagerlunda). Trzy podstawowe poziomy treści żołądkowej po sedymentacji to piana na górze, płyn w środku i stały składnik (objaw Wydlera; Gotsmy i in., 2019). Przy asfiksyjnym typie utonięcia w żołądku jest dużo płynu, a przy aspiracyjnym – niewiele. Możliwość pośmiertnego przenikania płynu do przewodu pokarmowego jest negowana przez większość autorów. Do wewnętrznych objawów ogólnych asfiksji należy objaw Paltauf-Reitera-Wachholza, czyli krwotoki w mięśniu mostkowo-obojęczkowo-sutkowym, mięśniach szyi, klatki piersiowej, pleców, w tym łopatki (Oshima, Ohtani, Mimasaka, 2019). Krwotoki w mięśniach nie są wynikiem drgawek agonalnych, lecz są spowodowane świadomie aktywnym nadmiernym ruchem kończyn górnych podczas tonięcia.

Objaw Ulricha to masywny krwotok do jamy ucha środkowego i kostnego przewodu słuchowego, charakterystyczny dla ostrego zanurzenia na dużą głębokość. Objaw Moro to nagromadzenie niewielkiej ilości płynu w jamie brzusznej, które potwierdza jedynie obecność zwłok w wodzie i rozwija się po 6–8 godzinach.

Typ aspiracyjny utonięcia (utonięcie w wodzie słodkiej) charakteryzuje się stabilną drobnopęcherzykową pianą o różowym odcieniu w kształcie grzybka lub w postaci „czapy śnieżnej”. Drobną pianą pęcherzykową w górnych drogach oddechowych, ewentualnie z zanieczyszczeniami gleby dennej i roślinności wodnej (objaw Krushevskiego), obecność piany wokół ust i nosa, tzw. piany zewnętrznej, wskazuje na utonięcie (Ryc. 3). Piana w drogach oddechowych, tzw. piana wewnętrzna, wskazuje na to, że ciało znajdowało się w wodzie (Reijnen i in., 2019). Płuca są powiększone, mają większą masę, dzięki czemu niemal wypełniają jamę opłucnową. Tkanica płucna ulega hiperhydratacji na skutek przenikania płynu ze środowiska – tzw. widok balonowy. Na tylnobocznych powierzchniach płuc, pod opłucną trzewną znajdują się duże mętne wylewy o bladoczerwonym zabarwieniu w postaci pasków lub plam (tzw. plamy Rasskazova-Lukomsky'ego-Paltaufa; Yang, Choi, Lee, Yoo, 2018).

Podczas utonięcia w słonej wodzie (morskiej) zachodzą procesy zagęszczenia krwi tętniczej o zwiększonej lepkości i hipowolemii. W płucach występuje obraz ostrego uszkodzenia płuc (*ALI – acute lung injury*) w postaci ogniskowej niedodmy, ostrego obrzęku i licznych

krwotoków ze znacznym zmniejszeniem powietrzności tkanki płucnej (Liu i in., 2014). W wyniku duszności wdechowej piana, która znajduje się w drogach oddechowych i płucach, zyskuje wygląd małego pęcherzyka o jasnym białym kolorze. Woda aktywnie dostaje się do dróg oddechowych, drażni błony śluzowe tchawicy i oskrzeli, powodując ruchy kaszlowe. Jednocześnie wydzielany jest śluz, który miesza się z wodą i powietrzem, tworząc piankową masę o szarobiałym kolorze, wypełniającą światło dróg oddechowych. Test okrzemkowy oraz badanie stanu równowagi elektrolitowej krwi nie wykazują zauważalnych zmian, tak więc diagnostyczne uzasadnienie opinii biegłych co do przyczyn zgonu odbywa się głównie w związku ze zmianami w płucach (Miyazato, Ishikawa, Michiue, Maeda, 2012).

W asfiksyjnym typie utonięcia skurcz krtani prowadzi do kilku procesów charakterystycznych dla tego typu utonięcia. Po pierwsze – jest to spadek ciśnienia w nosogardzieli, co prowadzi do różnicy ciśnień z otoczeniem i wypływu płynu do zatoki głównej kości (objaw Sveshnikova), a ślady płynu można znaleźć w zatoce czołowej i jamie ucha środkowego zatoki szczękowej i klinowej (Kawasumi i in., 2012). W rzeczywistości objaw Sveshnikova związany jest z czasem zanurzenia ciała w wodzie. Im dłużej ciało znajduje się w wodzie, tym większe prawdopodobieństwo, że woda dostanie się do zatok.

Po drugie – jest to wystąpienie duszności wydechowej, która prowadzi do przewentylowania płuc, rozwoju ostrej rozemdy i zwiększenia ich objętości, pęknięcia przegrody międzypęcherzykowej z wystąpieniem drobnych ogniskowych krwotoków. Płuca zyskują „marmurkowy wygląd”, zwiększoną powietrzność, wypełniają prawie całą jamę opłucnową, na powierzchniach bocznych widoczne są odciski żeber. W tchawicy i oskrzelach piana drobnopęcherzykowa nie występuje lub jest jej niewielka ilość. Przy nakłuciu lewego działu serca ujawniają się pęcherzyki powietrza.

Po trzecie – jest to zastój krwi żyłnej w krążeniu małym, a w konsekwencji nadciśnienie żyłne skutkujące wyrzutem erytrocytów do przewodu chłonnego piersiowego.

Podczas sądowo-lekarskich oględzin zwłok z typem odruchowym utonięcia nie stwierdza się śladów utonięcia i zmian we krwi, możliwe jest jedynie wykrycie współistniejących chorób układu krążenia i układu oddechowego.

Typ mieszany utonięcia występuje średnio w 35% przypadków i charakteryzuje się polimorfizmem stwierdzonych cech charakterystycznych dla różnych typów utonięć.

Obrzęk fałdów spojówkowych, „gęsia skórka”, obrzęk wątroby, ścian pęcherzyka żółciowego i fałdów wątrobowo-dwunastniczych (objaw Shkaravsky'ego-Rusakova), przesięk w jamach surowicznych (objaw Moro), maceracja skóry, zmarszczki moszny i sutków

oraz wypadanie włosów należą do cech świadczących o przebywaniu zwłok w wodzie, których nie można łączyć ze śladami utonięcia.

Zmiany mikroskopowe

Badanie histologiczne tkanki płucnej ujawnia ogniska rozedmy i obrzęku. W obszarze obrzęku pęcherzyki płucne są poszerzone, przegrody międzypęcherzykowe są miejscami cienkie, co czasem prowadzi do ich pęknięcia. W ogniskach rozedmy obraz jest odwrotny: naczynia włosowate są wypełnione krwią i poszerzone, pęcherzyki płucne są normalnej wielkości i wypełnione różową masą zawierającą nabłonek płaski i erythrocyty. Możliwe jest również wykrycie ognisk niedodmy tkanki płucnej z obszarami krwotoku w jej obszarze. Cząstki egzogene w postaci zanieczyszczeń glebą denną, roślinnością wodną i planktonem są rzadko wykrywane za pomocą mikroskopii. Zmiany naczyniowe w sercu charakteryzują się skurczem naczyń śródmiąższowych, niedokrwieniem naczyń włosowatych nasierdza. Tkanka pośrednia jest obrzęknięta i puszysta, a w nasierdzu znajdują się różne ogniska krwotoku.

W przypadku śmierci przez utonięcie następujące kryteria patologiczno-anatomiczne oraz sposoby badania mikroskopowego w tkance płucnej zasługują na uwagę (Dettmeyer, 2018):

- Określenie rozedmy wodnej;
- Wykrywanie uszkodzeń błony pęcherzykowo-kapilarnej;
- Określenie tzw. dyssemii płucnej;
- Liczba makrofagów pęcherzykowych;
- Wykrywanie pigmentowanych makrofagów płucnych w skojarzeniu z cząstkami pyłu i kryształami we krwi lewej komory oraz lewego przedsionka serca;
- Histochemiczne typowanie metamielocytów w tkance płucnej;
- Oznaczanie surfaktantu płucnego;
- Skaningowa mikroskopia elektronowa tkanki płucnej.

Zmiany histologiczne w przypadku utonięcia tracą wartość diagnostyczną wraz z rozwojem zmian autolitycznych i gnilno-rozpadowych. Do barwienia próbek pobranych podczas sekcji topielców najczęściej stosuje się hematoksylinę i eozynę (H&E). Barwienie metodą Gomori'ego oraz używanie podczas sekcji zamrożonych barwnika Sudan III (barwienie tłuszczu) są również zalecane jako rutynowe metody (Dettmeyer, 2018).

Test okrzemkowy

Obraz sekcyjny w przypadkach utonięcia może być nieprzekonujący, dlatego do uwiarygodnienia diagnozy utonięcia wykorzystuje się wyniki specjalnych badań laboratoryjnych. Plankton okrzemkowy ma zastosowanie w diagnozowaniu śmierci przez utonięcie (Xu i in.,

2011). Test okrzemkowy jest obecnie standardem w diagnostyce utonięcia, jednak wykonywany jest rutynowo tylko w jednej akademickiej jednostce medycyny sądowej w Polsce (Warszawa) oraz sporadycznie w dwóch innych ośrodkach, na wyraźne życzenie zleceńodawcy (Zakład Medycyny Sądowej w Bydgoszczy, Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie¹; Teresiński, 2016).

Obecność hydratu tlenku krzemu w skorupie okrzemek odróżnia je od innych rodzajów glonów. Krzemionkowa powłoka jest niepodatna na próchnicę, kwasy i wysokie temperatury.

Test okrzemkowy opiera się na wykrywaniu planktonu okrzemkowego obecnego w każdym środowisku wodnym; podczas wdychania przenika on przez barierę powietrzną i jest przenoszony wraz z krwiobiegiem do narządów wewnętrznych i tkanek.

Wiadomo, że długość i szerokość okrzemek przenikających do tkanek wątroby i nerek jest mniejsza niż stwierdzana w tkankach płuc i próbkach wody. Badania wykazały, że okrzemki *Pennatae* łatwiej przekraczają barierę pęcherzykowo-kapilarną, przemieszczają się we krwi i ostatecznie są odkładane w tkankach wątroby i nerek (Zhang i in., 2020).

Przy pośmiertnym zanurzeniu ciała w wodzie plankton okrzemkowy nie może przedostać się przez barierę aerohematyczną, tak więc jego obecność w płucach nie świadczy o utonięciu, ale jest oznaką zanurzenia w wodzie (Ryc. 4).

Obecnie jedyną dodatkową metodą stosowaną przez medyka sądowego jest wykrywanie planktonu okrzemkowego w tkankach izolowanych nerek metodą mikroskopii świetlnej. W celu oznaczenia okrzemek ze zwłok osób, które zmarły w wyniku utonięcia, należy do sekcji dostarczyć nierozciętą nerkę, gdyż zapobiega to przedostawaniu się planktonu okrzemkowego na zewnątrz. Kolejnym etapem jest przygotowanie mineralizatu z jej tkanki przy użyciu stężonych kwasów siarkowego i azotowego. Osad uzyskanego mineralizatu umieszcza się na szkiełku podstawowym, by poddać go oględzinom metodą mikroskopii w świetle przechodzącym. Obecność 20–30 okrzemek wskazuje na utonięcie.

Znanych jest ponad 20 000 gatunków glonów występujących w wodzie słodkiej, morskiej i na terenach podmokłych. Okrzemki to grupa glonów, które są aktywnie badane od 200 lat, a od 100 lat są wykorzystywane w praktyce sądowo-lekarskiej. Te jednokomórkowe mikroorganizmy o rozmiarach od 4 do 2000 mikronów są szeroko rozpowszechnione w zbiornikach wodnych. Wiadomo, że w każdym z nich występuje pewien zestaw typów planktonu okrzemkowego, który nie zmienia się w czasie. Jego zawartość jakościowa i ilościowa zależy od rodzaju zbiornika, w którym się znajduje – czy jest to staw z wodą stojącą, czy zbiornik, przez który przepływa

¹ Przep. red.: Obecnie w Instytucie Ekspertyz Sądowych nie przeprowadza się testów okrzemkowych.

woda. Okrzemki intensywnie rozmnażają się w zbiornikach wodnych, zwłaszcza wiosną i jesienią. Szczyt przypada na koniec marca, kwietnia oraz koniec sierpnia, września (Cai i in., 2016). Jest to podstawą możliwości wykorzystania planktonu okrzemkowego do ustalenia miejsca utonięcia (Krstic i in., 2002).

W środowisku naukowym nie ma zgody co do wiarygodności testu okrzemkowego. Jego wyniki bywają kwestionowane, a czasem obalane w sądach. Carballeira (2018) stwierdził obecność planktonu okrzemkowego w próbkach uzyskanych od osób, które nie zmarły w wyniku utonięcia. Badania ilościowe zawartości planktonu wykazały jednak, że istnieją statystyczne różnice w liczbie okrzemek w przypadkach fałszywie pozytywnych i w prawdziwych przypadkach utonięcia. Autorzy zalecają zastosowanie kompleksowej analizy z badaniem większej liczby narządów w celu potwierdzenia wyników utonięcia (Jian i in., 2019).

Wykorzystując model oparty na doświadczeniach na zwierzętach, opracowano test okrzemkowy do rozróżnienia lokalizacji topielców w różnych systemach wodnych, przydatny w określaniu miejsca utonięcia (Carvalho i in., 2019). Mapy diatomologiczne (*D-maps*) dla każdego zbiornika wodnego mogą być tworzone w celu bardziej precyzyjnego ustalenia miejsca utonięcia. Każda z takich map dostarczy istotnych informacji nie tylko dotyczących powszechnie występujących, jak też sezonowych lub rzadko występujących i specyficznych dla danego miejsca okrzemek, ale również poda jakościowe i ilościowe ich rozmieszczenie w różnych porach roku w danej części wód (Thakar, Singh, 2010). Autorzy, którzy badali próbki tkanek topielców pochodzące z okolic ujścia Duoro (Portugalia), stwierdzili silny związek między okrzemkami znalezionymi w próbkach biologicznych a obecnymi w próbkach wody z danego miejsca utonięcia (Coelho, Ramos, Ribeiro, Marques, Santos, 2016). Podkreślają również wielkie znaczenie stworzenia bazy okrzemkowej potencjalnych miejsc utonięć (np. rzek, mórz, jezior), która byłaby pomocna w ich odnajdywaniu.

Analiza częstości wykrywania okrzemek w narządach osób zmarłych w wyniku utonięcia wykazuje tendencję do zmniejszenia częstości ich wykrywania w ostatnich latach. Może to wynikać z tego, że materiał przeznaczony do badań ulega niszczeniu poprzez stosowanie stężonych kwasów, co niekiedy eliminuje możliwość wykrycia planktonu okrzemkowego (Tie i in., 2010). Może być także skutkiem tego, że sposób przygotowywania materiału przeznaczonego do badań, w którym stosuje się stężone kwasy, działa na tkanki niszcząco, co niekiedy eliminuje możliwość wykrycia planktonu okrzemkowego (Tie i in., 2010).

W niektórych przypadkach obecność okrzemek u topielców jest tak nieznaczna, że nie da się ich wykryć za pomocą mikroskopii. Wówczas na przykład fitoplankton

nie może być morfologicznie odróżniony od protobakterii czy pałeczek (Kakizaki, Sonoda, Shinkawa, Yukawa, 2019).

W celu zwiększenia efektywności i wyeliminowania wad metody klasycznej analizy okrzemkowej zaproponowano szereg innych, które zdaniem autorów są bardziej niezawodne.

Kakizaki i współautorzy oferują prosty, szybki i bezpieczny protokół wykorzystujący niedrogie odczynniki, takie jak papaina, SDS i 5N HCl do ekstrakcji okrzemek z tkanek płuc, nerek i wątroby. Papaina rozpuszcza wszystkie organy wystarczająco dobrze i umożliwia wyraźną wizualizację okrzemek, chociaż aktywność solubilizacyjna papainy jest nadal gorsza niż trawienie silnym kwasem. Metoda ta może być stosowana tam, gdzie istnieją ograniczenia w budżecie, sprzęcie, wyszkoleniu (Kakizaki i in., 2019). Aby uniknąć skutków działania stężonych kwasów, do przygotowania próbek tkanek można wykorzystać proteinazę K (Ludes, Quantin, Coste, Mangin, 1994). Autorzy udowodnili taką samą skuteczność tej techniki, jak w przypadku stosowania stężonych kwasów siarkowego i azotowego. Aby wykorzystać zalety metody trawienia mocnym kwasem i metody enzymatycznej, zaproponowano technikę łączącą te dwie metody (Yao, Kan, 2017). Jest ona bezpieczna w eksploatacji, w niewielkim stopniu zanieczyszczająca środowisko, dzięki czemu jest warta rozpowszechnienia. Dobrze sprawdza się również metoda izolacji planktonu okrzemkowego polegająca na demineralizacji tkanek z wykorzystaniem trawienia nadtlenkiem wodoru (Fucci i in., 2015). Trawienie nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) jest o wiele bardziej bezpieczną techniką laboratoryjną, zapewnia także lepszą konserwację okrzemek, dzięki czemu analiza taksonomiczna jest bardziej wiarygodna.

MD-VF-Auto SEM (*microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy*) jest nową jakościową i ilościową metodą badania okrzemek w diagnostyce utonięć. Oparta jest na technice trawienia mikrofalowego, filtracji próżniowej i automatycznej skaningowej mikroskopii elektronowej, co pozwala na maksymalny odzysk okrzemek i łatwą ich identyfikację dzięki wysokiej rozdzielczości tej metody (Zhao, Liu, Hu, He, Lu, 2013). Autorzy porównali skuteczność i dokładność metody (MD-VF-Auto SEM) z tradycyjnymi metodami izolacji okrzemek z użyciem kwasów. Nowa technika wykazała statystycznie lepsze wyniki diagnostyczne, może także znacznie przyspieszyć gromadzenie danych jakościowych i ilościowych w procesie tworzenia map okrzemek w rzekach i jeziorach (Zhang i in., 2020).

Metoda oparta na sztucznej inteligencji (*AI, artificial intelligence*) skojarzona z klasycznym podejściem do badania okrzemek, została zaproponowana jako sposób do automatycznego ich wykrywania. Polega ona na nauczaniu modeli CNN (*Convolutional Neural Network*) cyfrowych obrazów całopowierzchniowych rozmazów

okrzemek zapisanych na tysiącach lub dziesiątkach tysięcy płytek. Wyniki pokazały, że wytrenowany model pomaga automatycznie obliczyć skład jakościowy i ilościowy okrzemek w próbkach przygotowanych tradycyjnymi metodami (Zhou i in., 2019).

W innych badaniach sprawdzono skuteczność zastosowania systemu sztucznej inteligencji w porównaniu z pracą ekspertów w dziedzinie medycyny sądowej w zakresie wykrywania i identyfikacji różnych gatunków okrzemek. System sztucznej inteligencji został wstępnie wytrenowany do rozpoznawania różnych typów planktonu okrzemkowego. Okazało się, że szybkość działania systemu sztucznej inteligencji jest większa niż praca medyków sądowych. Wyniki tych prac stwarzają obiecujące perspektywy dla wykorzystywania w sposób automatyczny sztucznej inteligencji do badań okrzemek (Zhou i in., 2020).

Skład jakościowy i ilościowy okrzemek jest obecnie zwykle oceniany za pomocą mikroskopii świetlnej. Takie podejście jest powszechne, ale ma pewne ograniczenia, ponieważ podlega subiektywnej ocenie podczas klasyfikacji próbek fenotypowych, wymaga również eksperckiej wiedzy taksonomicznej. Zimmermann proponuje opracowanie alternatywnego i bardziej obiektywnego systemu identyfikacji okrzemek i oceny struktury okrzemek do analizy z wykorzystaniem podejścia opartego na sekwencji DNA (Zimmermann, Jahn, Gemeinholzer, 2011). Przedstawiona możliwość – tzw. ekologiczne sekwencjonowanie DNA – wykorzystuje krótki, ale specyficzny dla danego taksonu fragment DNA do jednoznacznej identyfikacji okrzemek z próbek wody.

Obecność DNA okrzemek w narządach wewnętrznych ofiary uznaje się za biologiczny dowód utonięcia. Niestety, stosowanie metody opartej na sekwencjach DNA okrzemek wymaga zgodnego stanowiska w sprawie ich poprawnej identyfikacji oraz stworzenia wiarygodnej biblioteki referencyjnej (Liu i in., 2020).

Laboratoryjne (pomocnicze) metody badawcze

Ponieważ badanie planktonu okrzemkowego jest najważniejszą metodą służącą do stwierdzenia utonięcia, inne instrumentalne metody badawcze stały się mniej popularne. W ostatnich latach opracowano i wdrożono wiele instrumentalnych metod pozwalających na prawidłowe potwierdzenie rozpoznania utonięcia.

Jedną z nich jest metoda pośmiertnej tomografii komputerowej (Tse i in., 2018). Po przeprowadzeniu serii eksperymentów z wykorzystaniem obrazów tomograficznych płuc autorzy stwierdzili, że utonięcie zwiększa objętość płuc, zaobserwowali także charakterystyczne zmętnienie typu *ground-glass* (rozproszony i jednolity wzrost gęstości) w porównaniu z grupą kontrolną (Jian i in., 2019). Wykorzystując metodę pośmiertnej tomografii komputerowej, można ocenić różnicę w objętości

i gęstości płynu zatokowego u ofiar utonięć w wodzie słonej i słodkiej. Stwierdzono, że gęstość płynu zatokowego w przypadku utonięcia w słonej wodzie jest znacznie większa niż w przypadku utonięcia w wodzie słodkiej (Kawasumi i in., 2016).

Na uwagę zasługują także badania, w których zajmowano się innymi metodami, szczególnie prace Maedy i współpracowników, którzy zaproponowali ważenie organów podczas autopsji topielców oraz wykorzystanie parametrów biochemicznych niektórych pierwiastków śladowych. Markery biochemiczne użyte w tych badaniach to azot mocznikowy, sód (Na), chlor (Cl), wapń (Ca) i magnez (Mg) we krwi i płynie osierdziowym. Autorzy ustalili wzorce stosunków pierwiastków śladowych we krwi, płynie osierdziowym i masie płuc, które mogą być z powodzeniem wykorzystane do ustalenia utonięcia (Maeda i in., 2009). Inni autorzy zasugerowali określanie zawartości trzech wskaźników jonowych: jonu sodowego (Na⁺), sumy jonów sodowych i potasowych (SUMNa + K) oraz sumy jonów sodowych, potasowych i chlorowych (SUMNa + K + Cl) w płynie kości klinowej (Yajima i in., 2018). Metoda taka okazała się pomocna w ustalaniu utonięcia, a także w określaniu, czy utonięcie nastąpiło w wodzie morskiej czy słodkiej. W przypadkach utonięcia objętość płynu i czas od śmierci nie były skorelowane, co sugeruje, że woda nie dostaje się do zatok po śmierci, zatem procesy gromadzenia się wody zachodzące w przypadkach utonięcia i nieutonięcia są różne.

Paulis i Hasan opracowali i zaproponowali eksperymentalną metodę określania utonięcia w wodzie słonej i słodkiej na podstawie analizy biochemicznej płynu mózgowo-rdzeniowego u królików (Paulis, Hasan, 2018). Stwierdzili oni, że poziom elektrolitów (z wyjątkiem poziomu potasu) w płynie mózgowo-rdzeniowym tych zwierząt po utonięciu w słonej wodzie był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej. U królików, które utonęły w słodkiej wodzie, badane elektrolity uległy znacznemu obniżeniu. Mocznik, kreatynina, kwas moczowy, glukoza i czynnik martwicy nowotworów również różniły się w przypadkach utonięcia w wodzie słodkiej i słonej od tych u królików kontrolnych.

Garland i współpracownicy donoszą o udanym zastosowaniu biochemicznej analizy płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku rozpoznania śmierci przez utonięcie (Garland, Philcox i in., 2019; Garland, McCarthy i in., 2019). Opisują oni przypadek utonięcia, które było wynikiem domniemanego samobójstwa i miało miejsce w słonej wodzie – pośmiertny poziom sodu i chloru w płynie mózgowo-rdzeniowym był tu podwyższony w porównaniu z poziomami u osób, których zgon nie nastąpił z powodu utonięcia. Przypadek ten wzmacnia tezę o przydatności potencjalnego zastosowania analizy pośmiertnego poziomu sodu i chloru w płynie mózgowo-rdzeniowym jako uzupełnienia do diagnozy utonięcia w słonej wodzie. Analiza biochemiczna płynu mózgowo-rdzeniowego, na

którą nie ma wpływu zanurzenie, może być alternatywną metodą określania utonięcia.

Jedną z opracowanych w ostatnich dziesięcioleciach morfologicznych metod diagnozowania utonięć jest metoda immunohistochemiczna, która polega na oznaczaniu białek (antygenów) w komórkach tkanek na podstawie reakcji antygen-przeciwciała (Ramos-Vara, 2005). Metoda opiera się na badaniach białka A (SP-A) związanego z surfaktantem, którego wzrost jest markerem w diagnostyce utonięć (Stemberga, Stifter, Cuculić, Coklo, Bosnar, 2009; Lee i in., 2017).

Barranco i współpracownicy (2019), posługując się głównie immunohistochemicznymi analizami P-selektyny, SP-A, HSP70, AQP-5 i fibronektyny, badali tkanki oddechowe u osób, których śmierć nastąpiła przez uduszenie. Celem pracy było zbadanie kontrastów pomiędzy zmianami zachodzącymi podczas uduszenia w wodzie słonej lub słodkiej oraz potwierdzenie odmiennych patofizjologii tych przypadków.

Wyniki badań immunohistochemicznych wykazały, że u osób, które utonęły, ekspresja białka akwaporyny-1 (AQP-1) i AQP-4 była wyższa niż u grupy zanurzonej pośmiertnie (Zhao, Yao, Hao, 2016). Badanie wzrostu ekspresji mRNA i białka AQP-1 i AQP-4 w płucach szczurów z ostrym uszkodzeniem płuc z powodu utonięcia byłoby przydatne w różnicowaniu utonięć życiowych od zanurzeń pośmiertnych.

Do diagnozowania utonięć proponuje się wykrywanie chlorofilu planktonu w próbce płuc za pomocą spektrofotometrii (SFPM; Jianping, Enshou, 1992).

Przedstawione metody mają szereg wad. Niektóre z nich, np. badania biochemiczne, nie mogą być stosowane ze względu na rozwój zmian autolitycznych i gnilnych, inne zaś są trudne do stosowania w warunkach, jakimi dysponują laboratoria kryminalistyczne. Dlatego ważne i potrzebne jest poszukiwanie nowych skutecznych metod diagnozowania utonięć.

Dyskusja

Diagnostyka utonięcia jako przyczyny zgonu jest istotnym zagadnieniem we współczesnej ekspertyzie sądowej. Kluczowe w niej jest ustalenie, czy doszło do utonięcia, lecz także określenie oznak zanurzenia. Dodatkowe utrudnienie stanowią przypadki tzw. śmierci w wodzie, gdy przyczyną zgonu mogły być różne choroby.

Makroskopowe i mikroskopowe ślady utonięcia są niespecyficzne, w dodatku w procesie rozkładu ulegają one szybkiemu zniszczeniu. Ślady te niekiedy występują, czasem ich brak, a nierzadko ich obecność nie ma związku z procesem tonięcia.

W większości przypadków zmiany autolityczne i gnilne nie pozwalają na naukowe uzasadnienie diagnozy utonięcia, dlatego dalsze poszukiwanie laboratoryjnych

metod jego diagnozowania powinno stanowić przedmiot zainteresowania naukowców. Nowe metody mogą okazać się pomocne w redukowaniu do minimum błędów będących skutkiem procesów gnilnych, nadal jednak pozostaną nieskuteczne podczas diagnozowania utonięcia.

Zaproponowane metody laboratoryjne mają wady, które ograniczają perspektywy ich zastosowania w praktyce. Wiele z nich ma tylko wąskie zastosowanie, nie pozwala to na inne wykorzystanie sprzętu i urządzeń do rozwiązywania innego typu problemów kryminalistycznych. Zdecydowana większość laboratoryjnych metod diagnozowania utonięć jest czasochłonna i wymaga specjalnie przeszkolonego personelu. Co więcej, wyniki stosowania wielu z nich nie zawsze cechuje wysoka wartość dowodowa.

Badania okrzemek w praktyce sądowo-lekarskiej znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce utonięć. Wykorzystując mikroskopię świetlną lub elektronową metody są jednak czasochłonne i obciążone ryzykiem uzyskania błędnych rozstrzygnięć zarówno pozytywnych, jak i negatywnych (Zhou i in., 2019). Obecnie poszukuje się skutecznych i wiarygodnych metod diagnozowania utonięć, których zastosowanie dostarczałoby wyników o wysokiej wartości dowodowej (Barranco i in., 2019).

Jedną z takich metod jest molekularna analiza genetyczna z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (*PCR – polymerase chain reaction*). Metoda ta opiera się na określeniu sekwencji kwasu nukleinowego DNA i pozwala na identyfikację genów specyficznych dla danego gatunku przy użyciu komplementarnych starterów.

Obecnie wdrażane są czułe i specyficzne metody PCR wykorzystujące DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) do identyfikacji 16S rDNA planktonu występującego powszechnie we wszystkich typach wód (He, Huang, Liu, Shu, Yin, Li, 2008; He, Huang, Liu, 2008). W celu oceny przydatności tej metody przeprowadzono detekcję 16S rDNA w planktonie znajdującym się w królikach, które zostały utopione, oraz w tych zanurzonych w wodzie po śmierci, a także w próbkach tkanek uzyskanych w wyniku sekcji zwłok zmarłych w wyniku utonięcia. DNA planktonu zidentyfikowano w płucach, wątrobie, nerkach, krwi i mózgu utopionych ofiar, a wykorzystanie wzorów DGGE pomogło wskazać miejsce utonięcia. Zdaniem autorów nowa, oparta na PCR-DGGE metoda, jest potencjalnie użytecznym narzędziem do diagnozowania utonięć.

Identyfikacja okrzemek metodami morfologicznymi poza poziomem rodzaju jest trudna i wymaga wiedzy eksperckiej. Ostatnio obiecującym podejściem do identyfikacji taksonomii okrzemek wydaje się koncepcja oparta na sekwencji kodu DNA (Li i in., 2019). We wspomnianej tu pracy autorzy przeprowadzili analizę morfologiczną okrzemek do poziomu rodzaju przy użyciu mikroskopu optycznego i elektronowego. Następnie

zaprojektowali i przeanalizowali sekwencje 18S rDNA jako barkody na poziomie gatunku. Badanie to ustaliło profil morfologiczny i barkod DNA dla okrzemek, co będzie miało duże znaczenie dla ich wykorzystania w oględzinach sądowo-lekarskich.

W procesie doskonalenia różnych metod badawczych stosujących PCR różni autorzy proponują wykorzystanie tych technik do wykrywania planktonu w przypadkach utonięć. Stosując *real-time* PCR z TaqMan, Uchiyama i współpracownicy opracowali dziewięć par starterów do wykrywania słodkowodnego lub morskiego fitoplanktonu (Uchiyama i in., 2012). Badania PCR dla fitoplanktonu były szybkie, mniej rygorystyczne, a wysoka czułość równie duża i jednoznaczna.

Stosowanie wspomnianego wyżej podejścia molekularnego, czyli testowania fitoplanktonu z użyciem łańcuchowej reakcji PCR z sondami TaqMan, umożliwia przeprowadzenie szybkich, mniej pracochłonnych testów o wysokiej wydajności w celu odróżnienia fitoplanktonu słodkowodnego od morskiego, a tym samym dostarcza molekularnego testu diagnostycznego pomocnego w diagnozie utonięć (Rutty i in., 2015).

W celu ustalenia utonięć w wodach słodkich proponuje się metodę amplifikacji genów *garb* i 16S rRNA pochodzących z *Aeromonas hydrophila* za pomocą PCR sprzężonego z elektroforezą kapilarną (Mai, Xu, Liu, Zhao, Han, 2016).

Obecność DNA fitoplanktonu wykrywanego za pomocą PCR jest niemal jedyną wiarygodną metodą diagnozowania utonięcia (Rącz i in., 2016; Aoyagi i in., 2006; Seo, Ichida, Sato, Kuroki, Kishida, 2014).

Metoda opierająca się na wykorzystaniu PCR w diagnozie utonięć okazała się bardziej wiarygodna, czuła, specyficzna i szybka w porównaniu z badaniem planktonu okrzemkowego z wykorzystaniem stężonych kwasów (Han, Wang, Li, Fan, Feng, 2013). Jedną z zalet stosowania metody PCR jest to, że molekularne badania genetyczne z reguły wymagają bardzo małej objętości tkanki, 1–3 mm³ (Schander, Hagnell, 2003).

Próbki narządów wewnętrznych do analizy PCR fitoplanktonu w przypadku utonięcia można uzyskać za pomocą współosiowej biopsji igłą tnącą z wykorzystaniem tomografii komputerowej nawet bez przeprowadzania autopsji (Rutty i in., 2017). Autorzy porównali wyniki testu PCR do wykrywania planktonu uzyskanego w wyniku autopsji i otrzymanego po zastosowaniu metody małoinwazyjnej z użyciem igły biopsyjnej. Metoda ta sprawdza się doskonale, zwłaszcza w przypadkach, gdy nie ma możliwości przeprowadzenia sekcji zwłok. Stosując taką procedurę, należy podjąć wszelkie środki ostrożności, aby uniknąć kontaminacji próbek biopsji rdzeniowej ze względu na czułość systemów analitycznych opartych na PCR.

Autorzy po raz pierwszy opisują zastosowanie współosiowej biopsji igłowej wspomaganej tomografią

komputerową do pobrania próbek tkanek wewnętrznych ciała, której celem jest analiza PCR bakterii podczas diagnozowania utonięcia. Przytaczany tu raport opisuje technikę biopsji, porównanie wyników biopsji igłowej i inwazyjnej autopsji, a także wyniki tomografii i autopsji. Zastosowanie takiego nowego podejścia do pobierania próbek biopsyjnych dla PCR fitoplanktonu stanowi postęp w badaniach opisanych we wcześniejszych pracach prezentujących minimalnie inwazyjne podejście tomografii komputerowej w diagnostyce utonięć.

Fitoplankton występuje we wszystkich typach zbiorników. Jeden z jego gatunków reprezentowany jest przez sinice należące do najbardziej prymitywnych istniejących roślin zawierających chlorofil. Są one uważane za jedne z pierwszych organizmów fotosyntetyzujących na naszej planecie (Gault, Marler, 2009).

Wiele gatunków cyjanobakterii wytwarza mikrocystyny, heptapeptydy, które powodują zatrucia zwierząt na całym świecie i są związane z problemami zdrowotnymi ludzi. Uważane są za najczęściej występujące i najbardziej rozpowszechnione z cyjanotoksyn, z ponad stu wariantami mikrocystyn (Bouhaddada, Nélieu, Nasri, Delarue, Bouaïcha, 2016).

Microcystis aeruginosa jest najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem cyjanobakterii wśród całego fitoplanktonu (Nasri, Delarue, Bouhaddada, 2016). Są to najprostsze glony jednokomórkowe, które nie posiadają jąder i mitochondriów. Kuliste i gromadne mikroskopijne kolonie rozwijają się w wodach słodkich o charakterze stagnującym i wolno płynącym. *Microcystis aeruginosa* powoduje powstawanie tzw. zakwitów wody i śmierć ryb, zwierząt, a także zachorowania u ludzi (Bouhaddada i in., 2016). Dzięki mikroskopijnym rozmiarom (0,2 do 2,0 mikronów) sinice mogą dostać się do narządów wewnętrznych osób, które zmarły w wyniku utonięcia (Uchigasaki i in., 2016; Voloshynovych, Kasala, Stambulska, Voloshynovych, 2019). Wykrywanie fitoplanktonu w narządach zamkniętych jest ważnym markerem w diagnostyce śmierci w wyniku utonięcia (Aoyagi i in., 2009; Abe i in., 2003).

Obecność fitoplanktonu w tkankach można wykryć nawet przy znacznych zmianach (Jianping, Nshou, 1992). Stosowanie PCR umożliwia zaobserwowanie fitoplanktonu niezauważalnego podczas stosowania tradycyjnych metod diagnostycznych z wykorzystaniem mikroskopii optycznej – metoda PCR wyróżnia się między innymi:

1. Wysoką czułością w wykrywaniu fitoplanktonu, co pozwala na określenie utonięcia przy wykorzystaniu minimalnej ilości materiału do badań oraz minimalnej ilości sinic lub planktonu okrzemkowego w porównaniu z metodami tradycyjnymi.
2. Dużą szybkością uzyskiwania wyników. Badanie zajmuje mniej czasu niż tradycyjne metody (Rutty i in., 2015).

- Wyższym poziomem bezpieczeństwa dla zdrowia personelu (podczas obróbki materiału w molekularnym badaniu genetycznym nie stosuje się stężonych kwasów; Idota i in., 2017).

Wnioski

Gdy zatem weźmie się pod uwagę wymienione teoretyczne i praktyczne problemy sądowo-lekarskiej diagnostyki asfiksji spowodowanej utonięciem na obecnym etapie rozwoju nauki, zrozumiałe jest zainteresowanie prowadzeniem praktycznych badań na ten temat. Makroskopowe i mikroskopowe objawy utonięcia są niespecyficzne – mogą być obecne, nieobecne lub niezwiązane z procesem utonięcia. Co więcej, w większości przypadków zmiany autolityczne i gnilno-rozpadowe nie pozwalają na naukowe uzasadnienie rozpoznania utonięcia, dlatego konieczne jest stosowanie kryteriów opartych na dowodach medycznych. Laboratoryjne metody badawcze często oparte są na technikach, które uniemożliwiają odtworzenie ich rezultatów w laboratorium kryminalistycznym, a ponadto uzyskane wyniki w wielu przypadkach nie mogą być traktowane jako dowody.

Obecnie główną, opartą na dowodach metodą diagnozowania utonięć jest wykrywanie planktonu okrzemkowego w tkankach izolowanych nerek za pomocą mikroskopii optycznej. Badanie mikroskopowe i identyfikacja planktonu okrzemkowego są jednak czasochłonne i wymagają dokładnych badań taksonomicznych. Co więcej, wadą tej metody jest stosowanie stężonych kwasów niszczących organy, co znacznie komplikuje, a czasem eliminuje możliwość wykrycia planktonu okrzemkowego. Wykrycie innych rodzajów fitoplanktonu w mineralizatach nerkowych jest interpretowane jako pseudoplankton i nie ma wartości diagnostycznej. Obecność planktonu okrzemkowego jest współcześnie główną, opartą na dowodach metodą diagnozowania utonięć. Analiza częstotliwości wykrywania okrzemek w narządach osób zmarłych w wyniku utonięcia wskazuje na tendencję do zmniejszenia częstotliwości ich wykrywania w ostatnich latach. Zjawisko to może wynikać z zastosowania wspomnianej wcześniej metody niszczącej materiał do badań poprzez stosowanie stężonych kwasów. W takich przypadkach stwierdzenie obecności DNA fitoplanktonu wykrytego metodą PCR w tkankach topielców jest niemal jedyną metodą diagnozowania utonięcia. Biorąc pod uwagę powyższe wnioski, można stwierdzić, że zastosowanie metody PCR w diagnostyce utonięć jest bardziej obiecujące niż używanie innych metod laboratoryjnych.

Obecny stan sądowo-lekarskiej diagnostyki asfiksji w wyniku utonięcia stwarza ryzyko popełnienia błędu przez biegłego. Szczególnie ważną kwestią w rozpoznaniu utonięcia jest uraz łączony lub niewystarczająca ekspresja klasycznych objawów asfiksji w wyniku utonięcia.

Aby zapobiec błędom diagnostycznym, konieczne jest znalezienie dodatkowych i skutecznych kryteriów, które oparte są na naukowych dowodach medycznych i zapewniają wiarygodność w określaniu przyczyny zgonu.

Oświadczenie o jawności

Żaden potencjalny konflikt interesów nie został zgłoszony przez autorów.