

А.М.Біляков

Національний медичний університет
імені О.О.Богомольця,
м. Київ

Ключові слова: прегненолон, холестерол, кортизол, травма, стероїдогенез.

Надійшла: 03.11.2012

Прийнята: 26.11.2012

УДК 81'42:616-091-051

КОРТИЗОЛ ТА ПРЕГНЕНОЛОН ЯК ДІАГНОСТИЧНІ КРИТЕРІЇ ВИЗНАЧЕННЯ ТРИВАЛОСТІ ВМИРАННЯ ЛЮДИНИ В РАННІЙ ТЕРМІН АНТЕМОРТАЛЬНОГО ПЕРІОДУ

Резюме. З метою встановлення тривалості вмирання у осіб, які померли внаслідок травматичної смерті, визначали вміст в тканині наднирників кортизолу та його попередника прегненолону. Встановлено, що в тканині наднирників у осіб, які померли внаслідок травматичної смерті прегненолон, як проміжний компонент стероїдогенезу, не визначається. Кількість кортизолу в тканині наднирників відрізняється в залежності від тривалості вмирання особи, що може бути використано як діагностичний критерій визначення тривалості вмирання людини в ранній термін антемортального періоду.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 4. – С. 18-21.

© А.М.Біляков, 2012

Bilyakov A.M. Cortisol and pregnenolone as diagnostic criteria for evaluating the duration of dying of a person at the early stages of antemortem period.

Summary. The content of cortisol and its precursor pregnenolone in adrenal tissue was evaluated with the purpose of determining the duration of dying of a human being influenced by a lethal traumatic factor. It is shown that pregnenolone as an intermediate component of steroidogenesis is not identified in adrenal tissue of the persons who died as a result of a traumatic factor influence. The amount of cortisol in adrenal tissue differs depending on the duration of dying of a person and can be used as a diagnostic criterion for evaluating the duration of dying of the person at an early stage of antemortem period.

Key words: pregnenolone, cholesterol, cortisol, trauma, steroidogenesis.

Вступ

В судово-медичній науці та практиці встановлення давності настання смерті та давності травматичних ушкоджень залишається одним із пріоритетних напрямків досліджень, адже встановлення тривалості життя потерпілого після отримання травми в ряді випадків має виключне значення, зокрема, коли це стосується своєчасності надання медичної допомоги.

При травматичних ушкодженнях людини наднирники відіграють виключну роль в адаптації організму, адже у відповідь на пошкодження активується гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникова система, яка має провідне значення у намаганнях організму стабілізувати показники гомеостазу.

Перш за все, це досягається за рахунок синтезу ними стероїдів – глюкокортикоїдів, серед яких найважливішу роль відіграє кортизол. Відомо, що гормони наднирників не депонуються в значній кількості, а синтезуються по мірі необхідності із попередника – холестеролу. При синтезі кортизолу, альдостерону, статевих гормонів в якості проміжної сполуки утворюється прегне-

нолон. Відщеплення бокового ланцюга холестеролу та утворення прегненолону – це швидкість-лімітуюча реакція. Бічний ланцюг холестеролу відщепляється внутрішньомітохондріальною ензиматичною системою, яка активується циклічною АМФ, а прегненолон, який при цьому утворюється, піддається подальшим перетворенням. В подальшому 3-β-гідроксистероїддегідрогеназа перетворює його на прогестерон, з якого буде синтезовано кортизол або ж перетворює на андростендіон, з якого буде синтезовано тестостерон (Peter M., Dubuis J.M., 2000).

За результатами гістологічних досліджень у осіб, смерть яких настала безпосередньо після травми, або через 20-30 хвилин, або через 1-2 години, були відмічені різні зміни, що свідчили про різний ступінь реакції ендокринних залоз на дію травматичного фактору (Яковцева А.Ф. и соавт., 2005). Так, при смерті яка настала практично відразу, у пінеалоцитах, адренкортикотропоцитах, спонгіоцитах, нейроендокриноцитах наднирникових залоз малоактивне ядро свідчить про наявність запасу гормонів. При смерті через 20-30 хвилин після травмування відбувається

аварійний викид гормонів, одночасно були помітні ознаки активації гормоносинтезу у вигляді збільшення розміру ядра і просвітлення хроматину. Збіднення цитоплазми спонгіоцитів ліpidними вакуолями, що містять холестерин також вказує на його посилене використання. Високоактивний морфофункціональний стан ядра, виражений апоптоз «зношених» паренхіматозних клітин спостерігається при тривалості післятравматичного періоду 1-2 годин (Пашенко Ю.В., 2004).

Метою нашого дослідження було вивчення кількісного вмісту кортизолу та його попередника прегненолону у осіб, смерть яких настала після дії смертельного травматичного фактору в ранній термін антемортального періоду: безпосередньо після травми, в короткий проміжок часу (від декількох хвилин до десятків хвилин) або через 1-2 години.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була тканина наднирників, яку було вилучено під час проведення судово-медичного дослідження трупів осіб, померлих від дії різних травматичних факторів. Всі об'єкти було згруповано в залежності від тривалості життя даних осіб після дії травматичного фактору: померлі безпосередньо після травми (грубе руйнування тіла, зокрема, при дорожньо-транспортних пригодах, падінні з висоти) – 11 осіб, померлі від декількох хвилин до десятків хвилин (колото-різана рана серця, травматичні ампутації кінцівок) – 9 осіб, померлі через 1-2 години (дорожньо-транспортні пригоди, ушкодження тупими та гострими предметами) – 8 осіб.

Вологу тканину наднирників, два шматочки вагою 1 г кожний, висушували при температурі 60°, повторно зважували та використовували весь матеріал для подальшого дослідження. Одну частину тканини гомогенізували з 1 мл бідистильованої води в скляному гомогенізаторі. Екстракцію проводили двічі 12,5 мл етилацетату та енергійно струшуючи гомогенат з розчинником в пробірці з притертою пробкою. З'єднаний екстракт поміщували на 16 годин в морозильну камеру холодильника (-10°C) та обережно зливали в грушовидну колбу. Екстракт випарювали досуха під вакуумом в потоці азоту на водяній бані при 45°C, концентруючи сухий залишок на дні колби. Сухий залишок розчиняли в мінімальному об'ємі суміші етилацетату та метанолу (1:1) та кількісно переносили на хроматографічну пластину Sorbifil. Хроматографування проводили в системі бензол-етилацетат (80:20) зі стандартом прегненолону. Проявлення проводили розчином оцтовокислої міді в розведеній ортофосфорній кислоті (6 г оцтовокислої міді розчиняли в розведеній ортофосфорній кислоті – 20,9 мл концентрованої ортофосфорної кислоти доведеної до об'єму 200 мл дистильованою водою).

Іншу частину тканини гомогенізували тричі з 2 мл етилацетату, який зливали в окрему пробірку та обмивали товкачик 1 мл етилацетату. Зібраний надосад етилацетату повністю упарювали в потоці теплого повітря та додавали 5 мл 70% метанолу. В пробірку додавали 5 мл петролейного ефіру, струшували 5 хвилин, центрифугували 3 хв та відділяли ефірну фазу в окрему пробірку. Цей цикл повторювали двічі з аналогічним об'ємом петролейного ефіру. До метанольної фази додавали рівний об'єм метиленхлориду, струшували 5 хвилин, центрифугували 3 хв та відділяли метиленхлорид. Цей цикл повторювали двічі з аналогічним об'ємом метиленхлориду. Зібраний метиленхлорид упарювали в потоці теплого повітря, додавали 0,1 мл етилацетату та кількісно переносили на хроматографічну пластину. Хроматографування проводили в системі хлороформ-метанол (97:3) зі стандартом кортизолу. Проявлення проводили розчином оцтовокислої міді на розведеній ортофосфорній кислоті.

Паралельно на хроматографічну пластинку наносили стандарт із суміші прегненолону та кортизолу у кількості 500 нг та 320 нг відповідно.

Після проявлення хроматограму сканували, а кількісний вміст визначали за допомогою розробленої нами програми та запатентованого способу (Патент на корисну модель № 54582, зареєстрований 10.11.2010 року), при якому програмно автоматично визначається площа плями досліджуваної речовини на хроматограмі після її сканування в порівнянні з площею плями стандарту (Біляков А.М., 2012).

Таким чином, загалом було проведено 84 досліджень, з яких 28 – для визначення вмісту прегненолону, 28 – кортизолу та 28 стандартів – прегненолону та кортизолу.

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів тонкошарової хроматографії показав, що у всіх групах осіб, померлих безпосередньо після травми, в короткий проміжок часу та через 1-2 години прегненолон не виявлявся.

Приклад проведеного дослідження кількісного вмісту кортизолу в тканині наднирників представлено на хроматограмі (рис. 1).

Результати визначення кількісного вмісту кортизолу в тканині наднирників у осіб, які померли безпосередньо після травми, в короткий проміжок часу, або через 1-2 години представлено в таблиці 1.

Аналізуючи дані, наведені в таблиці 1, видно що у осіб які померли в короткий проміжок часу чи через 1-2 години після травми, вміст кортизолу в тканині наднирників достовірно більше, ніж у тих, хто загинув безпосередньо після травми. Хоча вміст кортизолу в тканині осіб третьої групи менше, аніж другої, різниця не підтверджується статистично. Це вказує на активну про-

дукцію кортикостероїдних гормонів на протязі не менше як двох годин антемортального періоду.

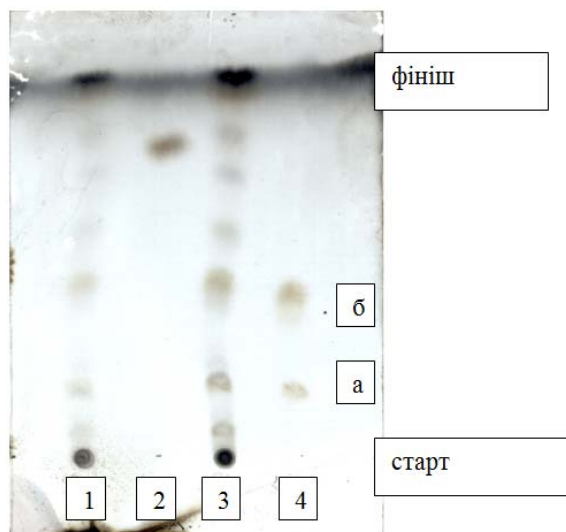


Рис. 1. Хроматограма. Вміст кортизолу в тканині наднирників осіб, померлих внаслідок травматичної смерті. 1, 2, 3 – об'єкти дослідження; 4 – стандарти кортизолу та кортизону; а – кортизол, б – кортизон.

Таким чином, активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи людини у відповідь на дію смертельного травматичного фактору супроводжується підвищеним синтезом кортизолу вже через декілька хвилин після дії даного фактору і триває не менше 2 годин. Тому кількісний вміст кортизолу може бути використаний як діагностичний критерій для встановлення тривалості вмирання людини після дії смертельного травматичного фактору.

Підсумок

Проведені дослідження показали, що кількість кортизолу в тканині наднирників відрізняється в залежності від тривалості перебігу смертельної механічної травми, що може бути використано як діагностичний критерій визначення тривалості вмирання людини в ранній термін антемортального періоду.

Перспективи подальших розробок

пов'язані з вивченням кількісного вмісту гормонів у осіб, смерть яких настала після дії смертельного травматичного фактору в ранній термін антемортального періоду.

Таблиця 1

Вміст кортизолу в наднирниках осіб з різною тривалістю антемортального періоду

№	Тривалість вмирання	n	Кількісний вміст кортизолу нг/100 мг сухої тканини X±x	P
1	Смерть безпосередньо після травми	11	780,7±62,7	P1-P2<0,01
2	Смерть в короткий проміжок часу (від декількох до десятків хвилин) після травми	9	1037,3±59,8	P2-P3>0,05
3	Смерть через 1-2 години після травми	8	975,6±65,9	P1-P3< 0,05

Примітка: P – вірогідність різниці кількісного вмісту між сусідніми групами дослідження.

Літературні джерела

Біляков А. М. Програмна обробка результатів тонкошарової хроматографії / Біляков А. М. // Актуальні питання судово-медичної науки, освіти і практики : матеріали всеукр. конф. – Алушта, 2012. – С. 92-94.

Динамика участия гипофиза, эпифиза и надпочечников в организации стресс-реакции при смертельной травме / А. Ф. Яковцова, Г. И. Губина-Вакулик, В. Д. Марковський, И. В. Сорокина // Патологія. – 2005. –Т. 2, № 3. – С. 35.

Пашенко Ю. В. Морфофункциональные

критерии продолжительности жизни пострадавшего после механической травмы / Пашенко Ю. В. // Роль сучасних методів діагностики в лікуванні та реабілітації хворих : матеріали конф. Харків. обл. клін. лікарні. – Харків., 2004. – С. 50-51.

Peter M. Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes / M. Peter, J. M. Dubuis // Eur. J. Clin. Investig. – 2000. – Vol. 30, № 3. – P. 14-20.

Биляков А.Н. Кортизол и его предшественник прегненолон как диагностические критерии установления длительности умирания человека в ранний срок антемортального периода.

Резюме. С целью установления длительности умирания людей, которые умерли вследствие травматической смерти, определяли содержание в надпочечниках кортизола и его предшественника прегненолона. Установлено, что в тканях надпочечников людей, которые умерли вследствие травматической смерти прегненолон, как промежуточный компонент стероидогенеза не определяется. Количество кортизола в ткани надпочечников отличается в зависимости от длительности течения смертельной механической травмы, что может быть использовано как диагностический критерий определения длительности умирания человека в ранний срок антемортального периода.

Ключевые слова: прегненолон, холестерол, кортизол, травма, стероидогенез.