

# СУДОВА МЕДИЦИНА

УДК 340.6:612.453:577.175.534:616-001.3

© А. М. БІЛЯКОВ, 2015

*А.М. Біляков*

## СИНТЕЗ КОРТИКОСТЕРОЇДІВ ПРИ ДИНАМІЧНОМУ РОЗВИТКУ СТРЕС-РЕАКЦІЇ В ВИПАДКАХ СМЕРТЕЛЬНОГО ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця

**Вступ.** В випадках смертельного травмування людей глюкокортикоїди є своєрідним маркером стресового стану і їх кількість змінюється в залежності від тривалості перебігу травматичної хвороби.

**Мета.** Вивчення балансу зміни кількісного вмісту кортизолу та його попередників - холестерину та його ефірів в тканині надниркових залоз в випадках смертельного травмування людей з різною тривалістю перебігу антемортального періоду: мінімальною (хвилини), середньою (десятки хвилин), тривалою (1-2 години).

**Матеріал.** Частини надниркових залоз від тридцяти трупів, які померли насильницькою смертю з різною тривалістю вмирання та від десяти раптово померлих внаслідок ішемічної хвороби серця. В надниркових залозах за методикою виділяли кортизол, холестерин та його ефіри з використанням тонкошарової хроматографії на пластинах Sorbifil. Після проявлення хроматограму сканували, а кількісний вміст визначали за допомогою розробленої нами програми та запатентованого способу, при якому програмно автоматично визначається площа плями досліджуваної речовини на хроматограмі після її сканування в порівнянні з площею плями стандарту.

**Результати.** Встановлено, що вмісту кортизолу, холестерину та його ефірів у осіб з мінімальною тривалістю вмирання не відрізняється від групи порівняння ( $p > 0,05$ ). У померлих через короткий проміжок часу вміст кортизолу ( $p < 0,001$ ) зростає паралельно зі зростанням вмісту холестерину ( $p < 0,001$ ), а вміст ефірів холестерину має тенденцію до зменшення ( $0,1 < p > 0,05$ ). Зі зростанням тривалості вмирання до декількох годин вміст кортизолу залишається стало високим ( $p < 0,01$ ), а от вміст ефірів холестерину ( $p < 0,05$ ) та холестерину ( $p < 0,01$ ) стрімко знижується. При цьому, особливої уваги заслуговує статистично значиме зростання вмісту холестерину ( $p < 0,001$ ) у померлих через короткий проміжок часу по відношенню до групи порівняння та інших груп досліджень ( $p < 0,01$ ). Виявлена залежність може стати діагностичним критерієм для встановлення тривалості перебігу антемортального періоду, якщо він становив короткий проміжок часу (десятки хвилин).

**Ключові слова:** кортикостероїди, кортизол, холестерин, ефіри холестерину.

**Вступ.** Після смертельного травмування не залежно від виду дії травмуючого фактору та терміну перебігу травматичного процесу організм людини знаходиться в стані динамічної неузгодженості, тобто в стресовому. Вцілому, стрес супроводжується морфофункціональними змінами, особливо в нейроендокринній системі, що пов'язано з активацією гіпоталамо-гіпофізарно надниркової системи [1], де надниркові залози відіграють виключну роль. Перш за все, це досягається за рахунок підвищеного синтезу глюкокортикоїдів

[2], серед яких найважливішу роль відіграє кортизол [3]. Глюкокортикоїди є своєрідним маркером стресового стану, саме тому їх кількість змінюється в залежності від тривалості перебігу травматичної хвороби. За результатами гістологічних досліджень встановлено, що у осіб, смерть яких настала через зрізні проміжки часу після травмування, був зафіксований різний ступінь реакції ендокринних залоз на дію травматичного фактору [4].

Відомо, що гормони наднирників не депонуються в значній кількості, а синтезуються по мірі необхідності із попередника – холестерину. В клітині наявні два фонди холестерину – мембранний та естерифікований (ліпопротеїдний). Кількість мембранного холестерину є відносно постійною і фактично не приймає участь в біосинтезі гормонів. Гормони синтезуються з вільного холестерину, який утворюється з естерифікованого по мірі необхідності [5]. Таким чином, вивчення балансу зміни кількісного вмісту кортизолу та його попередників при динамічному розвитку стрес-реакції в випадках смертельного травмування людей є перспективним напрямком для наукових досліджень.

**Мета.** Вивчення балансу зміни кількісного вмісту кортизолу та його попередників - холестерину та його ефірів в тканині надниркових залоз в випадках смертельного травмування людей з різною тривалістю перебігу антемортального періоду: мінімальною (хвилини), середньою (десятки хвилин), тривалою (1-2 години).

**Матеріали та методи.** З трупів тридцяти осіб, які померли від дії різних травматичних факторів, під час розтину вилучали частини наднирників та в подальшому об'єднували в групи в залежності від тривалості вмирання. Групою порівняння були особи, смерть яких настала від хронічної та гострої ішемічної хвороби серця – 10 осіб (раптова смерть). Один грам вологої тканини наднирників висушували при температурі 60 градусів, повторно зважували для визначення вмісту вологи та використовували весь матеріал для подальшого дослідження. Тканину гомогенізували тричі з 2 мл етилацетату, гомогенат зливали в окрему пробірку та обмивали товчачик 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 Sorbifil. Хроматографування проводили в системі хлороформ-метанол (97:3) зі стандартом кортизолу у кількості 320 нг. В ефірній фазі визначали її об'єм, відбирали 1 мл, повністю упарювали в потоці теплого повітря, розчиняли в 0,2 мл петролейного ефіру та кількісно переносили на хроматографічну пластину Sorbifil. Хроматографування проводили в системі петролейний-диетиловий ефір (4:1) зі стандартом холестерину у кількості 2,65 мкг. Зважаючи на різноманітність ефірів холестерину, їх кількісний вміст визначали відносно стандарту холестерину. Проявлення проводили розчином оцтовокислої міді на розведеній ортофосфорній кислоті.

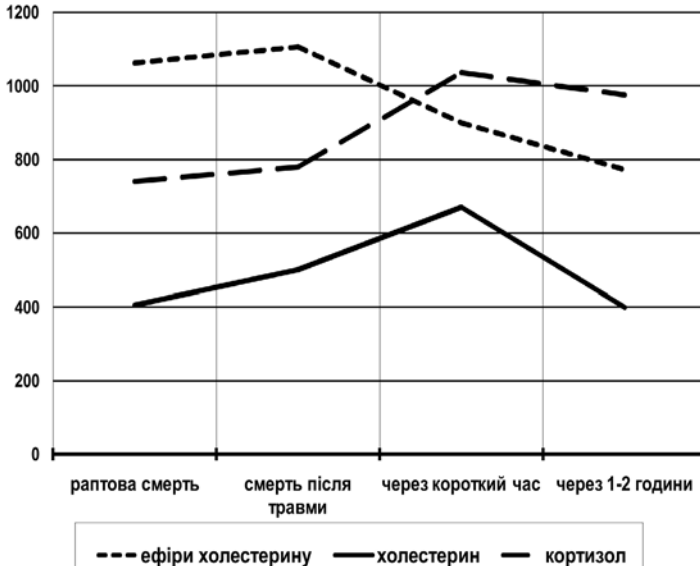
Після проявлення хроматограму сканували, а кількісний вміст визначали

за допомогою розробленої нами програми та запатентованого способу, при якому програмно автоматично визначається площа плями досліджуваної речовини на хроматограмі після її сканування в порівнянні з площею плями стандарту [6]. Таким чином, загалом було проведено 120 досліджень, з яких 90 для визначення вмісту кортизолу та його попередників при насильницькій смерті та 30 у померлих від ішемічної хвороби серця. Результати досліджень обробляли статистично за Стьюдентом.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведене нами вивчення кількісного вмісту кортизолу (нг/100 мг) в тканині надниркових залоз показало, що його вміст змінюється в залежності від тривалості перебігу травматичного процесу. У померлих відразу після травмування він становив  $780,7 \pm 62,67$ , у померлих через десятки хвилин  $1037,3 \pm 59,8$ , через 1-2 години  $975,6 \pm 65,98$  та в групі порівняння  $741,2 \pm 47,67$ . При статистичній обробці було встановлено, що вміст статистично достовірно вищий у тих, хто помер через десятки хвилин ( $p < 0,001$ ) та через 1-2 години після травмування ( $p < 0,01$ ) по відношенню до групи порівняння і не відрізняється у тих, хто помер відразу після травмування ( $p > 0,05$ ). Порівняння його вмісту в групах з різною тривалістю перебігу травми показало, що він також вищий у тих, хто помер через короткий проміжок часу ( $p < 0,01$ ) та через 1-2 години ( $p < 0,05$ ) порівняно з тими, хто помер відразу після травми.

Вміст холестерину (мкг/100 мг) у померлих відразу після травмування становив  $500 \pm 30$ , у померлих через десятки хвилин  $670 \pm 45$ , через 1-2 години  $400 \pm 34$  та в групі порівняння  $406 \pm 38$ . При статистичному аналізі було встановлено, що вміст більший у тих, хто помер через десятки хвилин ( $p < 0,001$ ) порівняно з групою порівняння та достовірно не відрізняється у тих, хто помер відразу після травмування ( $p > 0,05$ ) та через 1-2 години ( $p > 0,05$ ) після нього. Порівняння його вмісту в групах з різною тривалістю перебігу травми між собою показало аналогічно вищий рівень у осіб, які померли через короткий проміжок часу ( $p < 0,01$ ) по відношенню до інших груп досліджень. Вміст ефірів холестерину (мкг/100 мг) у померлих відразу після травмування становив  $1107 \pm 71$ , у померлих через десятки хвилин  $900 \pm 57$ , через 1-2 години  $773 \pm 34$  та в групі порівняння  $1062 \pm 97$ . Статистичний аналіз показав, що по відношенню до групи порівняння він не відрізнявся у тих, хто помер відразу після травмування ( $p > 0,05$ ), мав тенденцію до значимої різниці ( $0,1 < p > 0,05$ ) у тих, хто помер через десятки хвилин та значно був нижчим ( $p < 0,05$ ) у осіб з найдовшою тривалістю вмирання. Порівняння його вмісту в групах з різною тривалістю перебігу травми між собою показало, що у тих, хто помер через короткий проміжок часу ( $p < 0,05$ ) та через 1-2 години ( $p < 0,001$ ) він був значно нижчим, аніж в померлих відразу після травми.

Схематично динаміку зміни кількісного вмісту кортизолу та його попередників в тканині надниркових залоз зображено на рисунку.



**Рис. Вміст кортизолу та його попередників в тканині надниркових залоз у смертельно травмованих осіб та групи порівняння.**

Аналіз динаміки зміни кількісного вмісту кортизолу та його попередників в тканині надниркових залоз показує, що у осіб з мінімальною тривалістю вмирання їх вміст не відрізняється від групи порівняння. У померлих через короткий проміжок часу вміст кортизолу зростає паралельно зі зростанням вмісту холестерину, а вміст ефірів холестерину навпаки зменшується. Зі зростанням тривалості вмирання до декількох годин вміст кортизолу залишається стало високим, а от вміст ефірів холестерину та холестерину стрімко знижується. Вцілому, це відповідає загальновідомій динаміці зростання вмісту кортикостероїдів в залежності від тривалості перебігу травматичного процесу [7,8]. Однак, особливої уваги заслуговує статистично значиме зростання вмісту холестерину у померлих через короткий проміжок часу, що демонструє високу активність ферменту холестерол – естерази, який розщеплює ефіри холестерину та призводить до накопичення холестерину.

**Висновки.** Дослідження показали, що при динамічному розвитку стрес-реакції в випадках смертельного травмування людей при травмі в тканині надниркових залоз зростає кількісний вміст кортикостероїдів, а вміст холестерину та його ефірів корелює в залежності від тривалості перебігу травматичного процесу. Особливої уваги заслуговує статистично значиме зростання вмісту холестерину у померлих через короткий проміжок часу як по відношенню до групи порівняння ( $p < 0,001$ ), так і по відношенню до інших груп досліджень ( $p < 0,01$ ). Виявлена залежність може стати діагностичним критерієм для встановлення тривалості перебігу антемортального періоду, якщо він становив короткий проміжок часу (десятки хвилин). **Перспективою для подальшого розвитку** наукового дослідження може стати розробка діагностично значимих

критеріїв для встановлення тривалості перебігу антемортального періоду, що становив десятки хвилин з врахуванням генезу смерті.

#### Література

1. Зеленько О.А. Вплив комбінованої дії стрес-факторів на перебіг адаптаційних реакцій організму // Фізіол. Журнал. – 2002. – Т.48, №2. – С. 97-98.
2. McCullcrs D.L. Traumatic brain injury regulates adrenocorticosteroid receptor mRNA levels in rat hippocampus/ D.L. McCullcrs, P.G. Sullivan, S.W. Schcff et al. // Brain Res. – 2002. – V.947, №1. - P. 41-49.
3. Offner P.J. The adrenal response after severe trauma / P.J. Offner, E.E. Moore, D. Ciesla // Am. J. Surg. – 2002. – V.184, №6. – P. 649-653.
4. Яковцева А.Ф. Динамика участия гипофиза, эпифиза и надпочечников в организации стресс-реакции при смертельной травме / А.Ф. Яковцева Г.И. Губина-Вакулик, В.Д. Марковский // Патология. – 2005. – Т.2, №3. – С. 35.
5. Лопухин Ю.М., Ачкаров А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. Холестериноз. - Москва, 1983. – С. 163-171.
6. Біляков А.М. Програмна обробка результатів тонкошарової хроматографії. // Матеріали всеукраїнської конференції «Актуальні питання судово-медичної науки, освіти і практики». –Алушта. - 2012. – С.92-94.
7. Пащенко Ю.В. Морфофункциональные критерии продолжительности жизни пострадавшего после механической травмы // Матеріали ІІІ конференції Харківської обласної клінічної лікарні «Роль сучасних методів діагностики в лікуванні та реабілітації хворих». – Харків, 2004. – С. 50-51.
8. Offner P.J. The adrenal response after severe trauma / P.J. Offner, E.E. Moore, D. Ciesla // Am. J. Surg. – 2002. – V.184, №6. – P. 649-653.

**А.Н. Биляков**

### **Синтез кортикостероидов при динамическом развитии стресс - реакции в случаях смертельного травмирования людей**

**Национальный медицинский университет им. О.О. Богомольца**

**Вступление.** В случаях смертельного травмирования людей глюкокортикоиды являются своеобразным маркером стрессового состояния и их количество изменяется в зависимости от длительности течения травматической болезни.

**Цель.** Изучение баланса изменения количественного содержания кортизола и его предшественников - холестерина и его эфиров в ткани надпочечниковых желез в случаях смертельного травмирования людей с различной длительностью течения антемортального периода: минимальной (минуты), средней (десятки минут), длительной (1-2 часа).

**Материал.** Части надпочечниковых желез от тридцати трупов, которые умерли насильственной смертью с различной длительностью умирания и от десяти умерших скоропостижно вследствие ишемической болезни сердца. В надпочечниковых железах по методике выделяли кортизол, холестерин и его эфиры с использованием тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbifil. После проявления хроматограмму сканировали, а количественное содержание определяли при помощи разработанной нами программы и запатентованного способа, при котором программно автоматически определяется площадь пятна исследуемого вещества на хроматограмме после ее сканирования по сравнению с площадью пятна стандарта.

**Результаты.** Установлено, что содержание кортизола, холестерина и его

эфиров у лиц с минимальной длительностью умирания не отличается от группы сравнения ( $p > 0,05$ ). У умерших через короткий промежуток времени содержание кортизола ( $p < 0,001$ ) возрастает параллельно с содержанием холестерина ( $p < 0,001$ ), а содержание эфиров холестерина имеет тенденцию к уменьшению ( $0,1 < p > 0,05$ ). С возрастанием длительности умирания до нескольких часов содержание кортизола остается стабильно высоким ( $p < 0,01$ ), а вот содержание эфиров холестерина ( $p < 0,05$ ) и холестерина ( $p < 0,01$ ) стремительно снижается. При этом, особенного внимания заслуживает статистически значимое возрастание содержания холестерина ( $p < 0,001$ ) у умерших через короткий промежуток времени по отношению с группой сравнения и других групп исследования ( $p < 0,01$ ). Выявленная зависимость может стать диагностическим критерием для установления длительности течения антемортального периода, если он имел короткий промежуток времени (десятки минут).

**Ключевые слова:** кортикостероиды, кортизол, холестерин, эфиры холестерина.

**A.M. Biliakov**

## Synthesis of corticosteroids under dynamic development of stress-reaction in case of lethal injuries in humans

Bogomolets National Medical University

**Introduction.** In case of lethal injuries in people glucocorticoids are the markers of stress condition and their amounts change depending on the duration of the injurious disease.

**Aim.** Our research aimed at studying the balance of changes in the quantity of cortisol and its precursors, i.e. cholesterol and its esters, in the adrenal gland tissue in the case of lethal injuries in people with different duration of antemortem period: minimal (some minutes), middle (tens of minutes) and long (1 to 2 hours).

**Material.** Adrenal glands parts of thirteen dead bodies that had died as a result of violent death with different duration of dying and those of ten bodies who had suddenly died as a result of ischemic heart disease were used as the material for the research. A special method was used to extract cortisol, cholesterol and its esters from the adrenal glands using thin-layer chromatography with Sorbifil plates. After development the chromatogram was scanned and the quantity was determined with self-developed software and a patented method according to which the program automatically defines the area of a substance spot under research at the scanned chromatogram and compares it with the area of a reference spot.

**Results.** It is found out that the quantities of cortisol, cholesterol and its esters in people with the minimal duration of dying do not differ from the control group ( $p > 0,05$ ). In those who died within a short period of time the quantity of cortisol ( $p < 0,001$ ) increases in parallel with the increase of cholesterol quantity ( $p < 0,001$ ), and the quantity of cholesterol esters shows the tendency towards decreasing ( $0,1 < p > 0,05$ ). When the duration of dying increases to several hours, the quantity of cortisol remains stably high ( $p < 0,01$ ) but the quantities of cholesterol esters ( $p < 0,05$ ) and cholesterol ( $p < 0,01$ ) reduce quickly. At the same time statistically significant increase of cholesterol quantity ( $p < 0,001$ ) in those who died within a short period of time in comparison with the control group and other research groups ( $p < 0,01$ ) is worth mentioning. Thus, the detected correlation can become a diagnostic criterion for determining the duration of antemortem period if it lasted for a short period of time (tens of minutes).

**Key words:** corticosteroids, cortisol, cholesterol, cholesterol esters.

### **Відомості про автора:**

**Біляков Андрій Миколайович** - доктор мед.наук, доцент кафедри судової медицини НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: 04112, Київ, вул. Оранжевейна, 9, тел.: (044) 440 – 32 – 98.