

ПОСТМОРТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ КОМЫ ПО БИОХИМИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА ГЛАЗА

Акимов П.А.^{1,2}, Терехина Н.А.¹, Витер В.И.³, Баринов Е.Х.⁴

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, e-mail: p.a.akimov@yandex.ru, terekhina@list.ru;

²ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», Пермь;

³ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, Ижевск, e-mail: viki@udmnet.ru;

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, e-mail: e.v.barinov@mail.ru

Постмортальная биохимия является сравнительно новым направлением в судебной медицине, изучающей метаболизм в тканях после наступления смерти. При этом одной из главных задач является получение достоверных маркеров танатогенеза. Стекловидное тело глаза (СТ) является перспективным объектом исследования в постмортальной биохимии. Ранее был разработан способ диагностики гипогликемической комы по биохимическому анализу СТ. Вместе с тем не имеется каких-либо данных о встречаемости гипогликемической комы, как непосредственной причине смерти. Цель: использовать показатели углеводного обмена стекловидного тела глаза для оценки встречаемости гипогликемической комы в структуре причин смерти. В биообъектах от 2291 больного, страдавших при жизни СД, и 418 лиц без данного заболевания определяли содержание в крови гликогеоглобина, в СТ глюкозы и лактата. Биохимический анализ СТ позволил диагностировать гипогликемическую кому независимо от ее причины. Критерием наличия гипогликемической комы являлось отсутствие глюкозы и резкое снижение содержания лактата в СТ – менее 10 ммоль/л. Установлено, что гипогликемическая кома, как непосредственная причина смерти, у лиц пожилого возраста без наличия заболевания сахарный диабет составляет 11,5%, при сахарном диабете – 4,2%. Наличие этанола в организме при гипогликемической коме выявлено в 12,5% случаев среди больных СД, без наличия СД – в 6,2%. Полученные результаты рекомендуется использовать в судебно-медицинской практике при скрининговом исследовании трупов без видимых признаков насильственной смерти, что позволяет объективно оценить танатогенез. Предложен модифицированный метод определения гликогеоглобина в трупной крови. Биохимический анализ стекловидного тела глаза может быть использован для постмортальной диагностики гипогликемической комы. В структуре причин смерти доля гипогликемической комы у лиц, не имевших сахарный диабет, оказалась в 2,7 раза выше, чем у больных, страдавших при жизни сахарным диабетом.

Ключевые слова: гипогликемическая кома, судебная биохимия, стекловидное тело глаза, сахарный диабет, алкогольная интоксикация.

POSTMORTEM DIAGNOSIS OF HYPOGLYCEMIC COMA BY BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE VITREOUS BODY

Akimov P.A.^{1,2}, Terekhina N.A.¹, Viter V.I.³, Barinov E.K.⁴

¹E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, e-mail: p.a.akimov@yandex.ru, terekhina@list.ru;

²Perm regional Bureau of forensic medical examination, Perm;

³Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, e-mail: viki@udmnet.ru;

⁴Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, e-mail: e.v.barinov@mail.ru

Postmortem biochemistry is a relatively new branch of forensic medicine that studies tissue metabolism after death. One of the main tasks is to obtain reliable markers of tanatogenesis. The vitreous body of the eye (VB) is one of the promising objects of postmortem biochemistry. Previously, a method for diagnosis of hypoglycemic coma by biochemical analysis of VB was developed. However, there is no data of hypoglycemic coma as a direct cause of death. To use indicators of carbohydrate metabolism of the vitreous body to assess the occurrence of hypoglycemic coma in the structure of causes of death. In the biological objects of 2291 patients suffering during the life of diabetes mellitus (DM) and 418 persons without this disease, the blood content of glycohemoglobin and VB glucose and lactate content was determined. Biochemical analysis of VB allowed to diagnose hypoglycemic coma, regardless of its cause. The criterion for the presence of hypoglycemic coma was the absence of glucose and a sharp decrease in lactate content in VB - less than 10 mmol/L. It was found that hypoglycemic coma, as a direct cause of death, in elderly people without the presence of DM is 11.5%, in DM - 4.2%. The presence of ethanol in the body with hypoglycemic coma was revealed in 12.5% of cases among patients with DM, without DM - in 6.2%. The obtained results are recommended to be used in forensic practice in the screening study of corpses

without visible signs of violent death, which allows to objectively assess the tanatogenesis. We propose a modified method for the determination of glycohemoglobin in cadaveric blood. Biochemical analysis of the vitreous body can be used for postmortem diagnosis of hypoglycemic coma. In the structure of causes of death, the proportion of hypoglycemic coma in persons without diabetes mellitus was 2.7 fold higher than in patients with diabetes mellitus.

Key words: hypoglycemic coma, forensic biochemistry, vitreous body, diabetes mellitus, alcohol intoxication.

Постмортальная биохимия является новым направлением в судебной медицине. Специфика этого биохимического направления заключается в изучении закономерностей развития метаболических процессов в мертвом теле, витальной и постмортальной корреляции патологических процессов, установлении диагностических критериев для определения причины и условий наступления смерти. Биохимические исследования нередко оказываются основными в изучении танатогенеза и дифференциальной диагностике в постмортальном периоде. В последнее время все более широко стали внедряться современные методы биохимии для использования в судебно-медицинских целях, что резко повышает уровень постмортальной диагностики. Под влиянием различных факторов, как внешних, так и внутренних, происходят метаболические изменения в организме. Главной задачей постмортальной биохимии является изучение различных показателей метаболизма после наступления смерти. Известно, что одни биохимические показатели в постмортальном периоде сильно изменяются, другие сохраняются без изменений. Изучение данных параметров и используется для выявления достоверных маркеров танатогенеза. Возможности постмортальной биохимии для диагностических целей изложены и рекомендованы в Приказе № 346н от 12 мая 2010 г. «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации». Вместе с тем для диагностических целей разработаны и другие методы постмортальной биохимии. Объектами исследований при этом являются различные биологические жидкости, а также ткани.

Стекловидное тело глаза (СТ) является доступным и удобным объектом исследования в постмортальной биохимии. Ранее СТ было использовано для установления давности наступления смерти, в диагностике отравлений алкоголем и наркотиками. СТ меньше подвержено нарушению водного баланса, окружено плотными оболочками, более устойчиво к гнилостным изменениям в постмортальном периоде. В связи с этим установлена высокая информативность показателей при исследовании СТ.

Известны способы постмортальной диагностики при сахарном диабете гипергликемической комы по содержанию в СТ глюкозы, ацетоуксусной кислоты при диагностике кетоацидоза [1; 2]. Что же касается диагностики гипогликемической комы, то известны способы ее диагностики по содержанию лактата в крови, а также содержанию глюкозы и лактата в СТ. Указанные биохимические методы просты и доступны для

внедрения в практику [1; 3]. Исследование показателей углеводного обмена в СТ глаза в постмортальном периоде является достоверным и информативным методом, что подтверждено многочисленными исследованиями [4-6].

Гипогликемия определяется как аномально низкая концентрация глюкозы в крови (менее 2,8 ммоль/л). В постмортальном периоде диагностика гипогликемии практически невозможна ввиду быстрой утилизации глюкозы в крови. По данным литературы, гипогликемическая кома в клинической практике нередкое явление. Так, гипогликемические состояния наиболее часто встречаются при алкоголизме (15-40%) и передозировке многими лекарственными препаратами (13-32%). Также отмечены случаи развития гипогликемии при большой физической нагрузке, хронической почечной недостаточности и других состояниях. Очень редко наблюдается развитие гипогликемии у больных СД - до 3% [7; 8]. Вместе с тем не имеется каких-либо данных о встречаемости гипогликемической комы, как о непосредственной причине смерти.

Цель исследования: использовать показатели углеводного обмена стекловидного тела глаза для оценки встречаемости гипогликемической комы в структуре причин смерти.

Материалы и методы исследования. Проведено скрининговое исследование за 2016-2018 гг. секционного материала больных, стоявших при жизни на учете с заболеванием сахарный диабет, и лиц пожилого возраста. Постмортально проведен биохимический анализ крови и СТ от 2291 больного СД и 418 лиц без данного заболевания на базе судебно-медицинской лаборатории Пермского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы. Биохимические исследования биологического материала в судебно-медицинских целях имеют свои особенности, поэтому мы даем описание всех методик.

5 мл крови забирали из крупных венозных сосудов. В крови определяли содержание гликогемоглобина колориметрическим методом с тиобарбитуровой кислотой с использованием набора реактивов «Гликозилированный гемоглобин (ГНВ 100)» (Lachema, Чехия) в нашей, описанной далее, модификации, что служило критерием подтверждения наличия заболевания СД при жизни пострадавших (более 7,0 мкмоль фруктозы на грамм гемоглобина). Гликогемоглобин представляет собой продукт конденсации глюкозы и бета-цепи гемоглобина. Известно множество методов определения гликогемоглобина: хроматографические, колориметрические, флуорометрические, иммунологические, электрофоретические, изоэлектрофокусирования. Чаще используются методы колоночной хроматографии и колориметрические. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки, а при оценке результатов для каждого метода используются свои референтные величины. При использовании данного метода определению не мешает ни лабильная форма гликогемоглобина, ни фетальный гемоглобин, а также возможно исследование

гемолизированной крови, что часто наблюдается в постмортальном периоде.

Проведение анализа. Кровь центрифугировали и 0,3-0,5 мл эритромаcсы гемолизировали не менее 30 минут в 5,0 мл 0,04% раствора аммиака. Гемолизат центрифугировали 20 минут при 5600 g, после чего фильтровали. Определение общего гемоглобина проводили стандартным гемиглобинцианидным методом. Для этого 0,2 мл очищенного гемолизата вносили в 5,0 мл трансформирующего раствора. На спектрофотометре СФ-2000 проводили регистрацию оптической плотности через 30 минут (длина волны 540 нм). Для количественного определения фруктозы в опытной пробе 1,8 мл полученного гемолизата вносили в мерную пробирку, добавляли 0,3 мл концентрированной фосфорной кислоты и отмечали уровень жидкости. В отдельные пробирки вносили, соответственно, для контрольной пробы 1,8 мл дистиллированной воды, в качестве стандартного раствора 1,8 мл фруктозы в концентрации 250 мкмоль/л. Пробирки закрывали резиновыми пробками, тщательно встряхивали. Время инкубации 30 минут в термоблоке при 100 °С. После гидролиза пробирки охлаждали в холодной воде, контролировали первоначальный уровень жидкости и при необходимости доводили до метки дистиллированной водой. Далее добавляли по 0,6 мл трихлоруксусной кислоты в концентрации 2,45 моль/л, тщательно встряхивали содержимое пробирок. Центрифугировали 20 минут при 1600 g. Затем в отдельные пробирки, содержащие по 1,0 мл тиобарбитуровой кислоты в концентрации 50 ммоль/л, вносили по 2,0 мл полученного супернатанта. Инкубацию проводили в термоблоке при 37 °С в течение 40 минут. После охлаждения пробирок, используя спектрофотометр PD-303, проводили измерение оптической плотности при длине волны 443 нм.

Концентрацию гликогемоглобина GHB, мкмоль фр/г Hb (мкмоль фруктозы / г гемоглобина), вычисляли по формулам

$$GHB = C_{фр} : Hb , \quad (1)$$

$$C_{фр} = (D_{оп} : D_{ст}) \cdot C_{ст} , \quad (2)$$

$$Hb = (64,458 \cdot 5,2 \cdot D_{540}) : (44 \cdot 0,2) , \quad (3)$$

где $C_{фр}$ – концентрация фруктозы в гемолизате крови, мкмоль/л;

Hb – концентрация общего гемоглобина гемолизата, г/л;

$D_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$D_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора фруктозы;

$C_{ст}$ – концентрация фруктозы в стандартном растворе, 250 мкмоль/л;

64,458 – миллимолярный вес гемоглобина, г;

5,2 – общий объем трансформирующего раствора и гемолизата, мл;

D_{540} – оптическая плотность раствора для определения общего гемоглобина;

44 – миллимолярный коэффициент экстинкции гемиглобинцианида;

0,2 – объем гемолизата для определения общего гемоглобина, мл.

Для получения 2 мл СТ делали шприцем прокол наружного угла глаза. Перед исследованием СТ центрифугировали 20 мин в пластиковых пробирках при 5600 g. Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора реактивов «Фотоглюкоза» («Импакт», Москва), лактата (молочной кислоты) – колориметрическим энзиматическим методом с использованием набора реактивов Lactic acid («Витал Диагностикс СПб», Санкт-Петербург).

Для определения глюкозы в пробирки наливали по 2,5 мл ферментно-буферного раствора реактива. Далее вносили по 0,15 мл жидкости СТ (опытные пробы), раствор глюкозы в концентрации 1,25 ммоль/л (стандартный раствор) и воды (контрольная проба). Пробирки инкубировали в термоблоке 40 минут при 37 °С. Пробирки несколько раз встряхивали в течение инкубации. Измеряли оптическую плотность стандартного раствора и опытных проб на спектрофотометре PD-303 при длине волны 495 нм относительно контрольной пробы.

Концентрацию глюкозы в стекловидном теле С, ммоль/л, вычисляли по формуле

$$C = (D_{пр} : D_{ст}) \cdot 1,25 \cdot R, \quad (4)$$

где $D_{пр}$ – оптическая плотность пробы;

$D_{ст}$ – оптическая плотность калибровочного раствора глюкозы;

1,25 – концентрация глюкозы в стандартном растворе, ммоль/л;

R – коэффициент дополнительного разведения пробы.

Для определения лактата в пробирки наливали по 2,0 мл ферментно-буферного раствора реактива. Далее вносили по 20 мкл жидкости СТ (опытные пробы), раствор молочной кислоты в концентрации 3,33 ммоль/л (стандартный раствор) и воды (контрольная проба). Пробирки инкубировали в термоблоке 20 минут при 37 °С. Пробирки несколько раз встряхивали в течение инкубации. Измеряли оптическую плотность стандартного раствора и опытных проб на спектрофотометре PD-303 при длине волны 505 нм относительно контрольной пробы. Перед исследованием проводится дополнительное разведение жидкости СТ в 10 раз. При наличии гипоккомы разведение обычно не требуется.

Концентрацию лактата в стекловидном теле С, ммоль/л, вычисляли по формуле

$$C = (D_{пр} : D_{ст}) \cdot 3,33 \cdot R \quad (5)$$

где $D_{пр}$ – оптическая плотность пробы;

$D_{ст}$ – оптическая плотность калибровочного раствора молочной кислоты;

3,33 – концентрация молочной кислоты в стандартном растворе, ммоль/л;

R – коэффициент дополнительного разведения пробы.

Результаты исследования и их обсуждение. Критерием наличия гипогликемической комы являлось отсутствие глюкозы и резкое снижение содержания лактата в СТ. Ранее нами было установлено, что содержание лактата в СТ ниже 10 ммоль/л при отсутствии в нем глюкозы является метаболическим маркером гипогликемической комы [1; 3]. Оказалось, что содержание лактата в трупной крови резко увеличено по сравнению с показателями у живых людей. Резкий подъем концентрации лактата, в 20-30 раз, происходит в агональный период. Незначительное увеличение отмечается и в постмортальном периоде, что связано с процессом гликолиза в эритроцитах. Наличие лактата в СТ обусловлено довольно быстрым током жидкости, обеспечивающим поступление и выведение веществ в СТ. В агональном периоде происходит быстрая экскреция лактата через ретинальные сосуды. Установлено, что чем длительнее период агонии, тем большее количество лактата выявляется в СТ. В среднем содержание лактата в СТ около 26 ммоль/л. В половине всех случаев наступления смерти в результате гипогликемической комы лактат в СТ не определялся.

Среди больных СД наличие гипогликемической комы установлено у 96 пострадавших, что составило 4,2%. Данный показатель согласуется с полученными ранее данными (8,9–2,1%) [1; 3; 9]. Намного чаще у больных СД отмечаются коматозные состояния, связанные с гипергликемией. Среди лиц без данного заболевания гипогликемическая кома установлена у 48 умерших, что составило 11,5%. Данный показатель в 2,7 раза выше, чем у больных СД. Не исключено, что при более полном скрининге - исследовании лиц молодого и среднего возраста, данный показатель будет значительно выше (таблица).

Частота гипогликемической комы у лиц без наличия сахарного диабета

Возрастная группа, лет	n	n1	%	A
менее 51	15	2	13,3	
51 - 55	14	2	14,3	
56 - 60	25	2	8,0	
61 - 65	45	5	11,1	2,3 / -
66 - 70	72	9	12,5	
71 - 75	45	8	17,8	0,6 / 0,2
76 - 80	70	6	8,6	
81 - 85	66	9	13,6	0,5 / 0,0
86 - 90	48	4	8,3	
более 90	18	1	5,5	
ВСЕГО	418	48	11,5	

n – количество наблюдений, n1 – наличие гипогликемической комы, A – концентрация этанола в г/л (кровь/моча) при гипогликемической коме

Установлено, что у больных СД, скончавшихся в результате гипогликемической комы, содержание этанола в организме выявлено в 12 случаях (12,5%). При этом

концентрация этанола в крови выше 2,1‰ отмечена в 3 случаях. Среди лиц без наличия СД в состоянии алкогольного опьянения при наступлении смерти в результате гипогликемической комы находилось 3 человека (6,2%), соответственно с умеренной концентрацией этанола только 1. Таким образом, подавляющее большинство пострадавших были трезвыми.

Известно, что гипогликемические состояния чаще всего наблюдаются после употребления алкоголя. При этом гипогликемия развивается не только при злоупотреблении алкоголем, но и у здоровых лиц. К развитию длительной тяжелой гипогликемии приводит употребление большого количества этанола, так как нарушаются метаболические функции печени: угнетается глюконеогенез и метаболизм гликогена. Факторами риска развития гипогликемии являются большой перерыв между приемами пищи, прием спиртного натощак, тяжелая физическая нагрузка [10]. Гипогликемия имеет несколько вариантов развития. Реактивная гипогликемия подразделяется на раннюю и позднюю. Ранняя реактивная гипогликемия возникает через 5–10 минут после приема алкоголя на фоне интенсивных физических нагрузок или на фоне голодания в течение 1–2 суток. Поздняя реактивная гипогликемия развивается через 3–5 часов после приема алкоголя [11]. Большинство зарубежных исследований подтверждает неблагоприятное воздействие гипогликемии на процесс вождения, что связано с автомобильными катастрофами из-за приема спиртного [12]. Токсическая гипогликемия может проявиться на 2–3-е сутки и более после приема алкоголя. Однако чаще такая гипогликемия развивается через десятки часов и наблюдается у хронических алкоголиков, особенно у тех, кто не употребляет пищу [11]. Известно, что риск развития гипогликемии резко возрастает в утренние часы после употребления этанола в вечернее время, особенно после приема спиртного натощак, через 10–12 часов [10; 13]. Ятрогенная гипогликемия является неизбежным побочным эффектом сахароснижающей терапии [14]. Передозировка и других лекарственных препаратов также вызывает коматозные состояния, связанные с гипогликемией. Так, по данным литературных источников, установлено 164 препарата, которые вызывают гипогликемию [15].

Таким образом, биохимический анализ стекловидного тела позволил диагностировать гипогликемическую кому независимо от ее причины. Установлено, что гипогликемическая кома, как непосредственная причина смерти, у лиц пожилого возраста без наличия заболевания сахарный диабет составляет 11,5%, при сахарном диабете - 4,2%. Данные исследования рекомендуются использовать в судебно-медицинской практике при скрининговом исследовании трупов без видимых признаков насильственной смерти, что позволяет объективно оценить танатогенез. Разработанный способ диагностики гипогликемической комы внедрен в практическую работу ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». Необходимо отметить, что выявление метаболических

нарушений в постмортальном периоде позволяет определять маркеры танатогенеза и использовать их в диагностических целях.

Выводы. Предложен модифицированный метод определения гликогемоглобина в трупной крови. Биохимический анализ стекловидного тела глаза может быть рекомендован для постмортальной диагностики гипогликемической комы. В структуре причин смерти доля гипогликемической комы у лиц, не имевших сахарный диабет, оказалась в 2,7 раза выше, чем у больных, страдавших при жизни сахарным диабетом.

Список литературы

1. Акимов П.А., Терехина Н.А. Биохимические показатели стекловидного тела глаза в диагностике заболеваний // Пермский медицинский журнал. 2016. № 4. С.61-64.
2. Терехина Н.А., Акимов П.А. Биохимический анализ стекловидного тела глаза в постмортальной диагностике диабетических ком // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2005. № 2. С.24-25.
3. Акимов П.А., Терехина Н.А. Биохимический анализ стекловидного тела глаза в постмортальной диагностике гипогликемической комы // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2012. № 4. С.60-62.
4. Ермакова Ю.В. Стекловидное тело как объект исследования в судебной медицине // Вестник судебной медицины. 2012. № 2. С.43-45.
5. Zilg B., Alkass K., Berg S., Druid H. Postmortem identification of hyperglycemia. Forensic Sci Int. 2009. vol. 185. no. 1-3. P. 89-95.
6. Hess C., Wöllner K., Musshoff F., Madea B. Detection of diabetic metabolism disorders post-mortem – forensic case reports on cause of death hyperglycaemia. Drug Test Anal. 2013. vol. 5. no. 9-10. P. 795-801.
7. Lionte C., Sorodos L., Laba V. Toxic-induced hypoglycemia in clinical practice. Rom. J. Intern. Med. 2004. vol. 42. no. 2. P. 447-455.
8. Mendoza A., Kim Y.N., Chernoff A. Hypoglycemia in hospitalized adult patients without diabetes. Endocr. Pract. 2005. vol. 11. no. 2. P. 91-96.
9. Лобанова М.В. Гипогликемическое состояние и гипогликемическая кома при сахарном диабете // Военная медицина. 2014. № 1 (30). С. 137-139.
10. Зороастров О.М. Экспертиза острой смертельной алкогольной интоксикации при исследовании трупа. Тюмень, 2003. 74 с.
11. Бокарев И.Н., Великов В.К., Шубина О.И. Об опасной для жизни алкогольной гипогликемии у лиц, не страдающих сахарным диабетом // Клиническая медицина. 1999.

№ 3. С.29-32.

12. Дуничева М.Н., Мартьянова О.Ю., Патракеева Е.М., Залевская А.Г. Сахарный диабет и вождение автомобиля // Сахарный диабет. 2016. № 5. С.414-420.

13. Зороастров О.М. Особенности танатогенеза при смерти от острой интоксикации этанолом // Вестник судебной медицины. 2016. № 3. С.42-44.

14. Погорелова А.С. Гипогликемия как фактор внезапной смерти // Медицинский совет. 2016. № 4. С. 96-99.

15. Murad M.H., Coto-Yglesias F., Wang A.T., Sheidaee N., Mullan R.J., Elamin M.B., Erwin P.J., Montori V.M. Clinical review: Drug-induced hypoglycemia: a systematic review. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009. vol. 94. no. 3. P. 741-745.