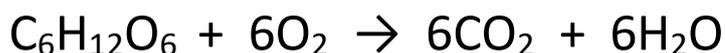


Применение вакутайнеров в судебно-медицинской практике.

*А.Л.Коновальцев, А.Л.Печников, С.В.Пятчук,
30 октября 2009 года
г. Салехард.*

Согласно современным данным, для поддержания нормальной жизнедеятельности, живым организмам необходима энергия. Эта энергия может быть получена через обмен веществ в организме или иначе, посредством метаболизма.

Главная задача метаболизма - обеспечение организма за счет окисления пищевых веществ энергией, которая генерируется в форме АТФ (аденозинтрифосфат). Одним из самых главных источников энергии является глюкоза, которая, либо поступает в организм извне с пищей, либо синтезируется в самом организме в процессе метаболизма белков (аминокислот), жиров (триглицеридов) и других углеводов. Окисление глюкозы может быть представлено суммарным уравнением:



При этом изменение свободной энергии этой суммарной реакции составляет $\Delta G^0 = -2820 \text{ КДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. В клетках организма при окислении одной молекулы глюкозы образуется более 30 молекул АТФ (аденозинтрифосфата). Весь процесс окисления глюкозы до CO_2 и H_2O условно разделяется на три этапа:

1. Гликолиз - процесс расщепления молекулы глюкозы или глюкозильного остатка гликогена на две молекулы пирувата (анион пировиноградной кислоты). Гликолиз может протекать как в аэробных условиях (в присутствии кислорода), так и анаэробных условиях (при недостаточности кислорода). Соответственно бывает аэробный и анаэробный гликолиз.
2. Цикл Кребса (синонимы: цикл лимонной кислоты, цикл трикарбоновых кислот) - это совокупность реакций, в результате которых происходит восстановление таких переносчиков электронов, как NADH (никотинамидадениндинуклеотид) и FADH_2 (флавинадениндинуклеотид).
3. Электронтранспортная цепь - это последовательный процесс переноса электронов от NADH и FADH_2 на кислород, в результате которого образуется наибольшее количество молекул АТФ, т.е. энергии.

Все эти биохимические превращения протекают в живом организме. При смертельном исходе, данные процессы останавливаются и начинаются процессы

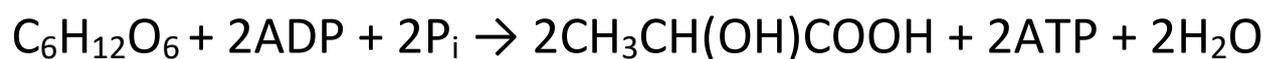
аутолиза, когда собственные структуры разлагаются под действием своих же ферментов. Далее развиваются процессы гниения в трупe, в результате которых происходит разложение сложных органических соединений до более простых под воздействием различных микроорганизмов. Размножаясь с огромной скоростью микроорганизмы, также нуждаются в получении энергии. Наиболее примитивным способом получения этой энергии с точки зрения микробиологии, являются процессы брожения. Процесс брожения характеризует энергетическую сторону способа существования различных групп микроорганизмов, при котором они осуществляют в анаэробных условиях окислительно-восстановительные превращения органических соединений, сопровождающиеся выходом энергии в виде АТФ. Обычно в процессе брожения образуется несколько продуктов. В зависимости от того, какой основной продукт накапливается в среде, различают молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое и другие виды брожений.

С точки зрения судебной медицины наибольшую значимость имеет спиртовое брожение, так как при этом процессе возможно посмертное новообразование этанола в трупном материале и исчезновение некоторых субстратов, что влечет за собой получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Особенно это актуально при различных авиакатастрофах, ДТП, смертельных случаев на производстве и т.п.

Спиртовое брожение и накопление этилового спирта в анаэробных условиях распространено среди прокариотных (различные группы анаэробных эубактерий) и эукариотных (дрожжи) форм микроорганизмов. Суммарная реакция спиртового брожения выглядит следующим образом:

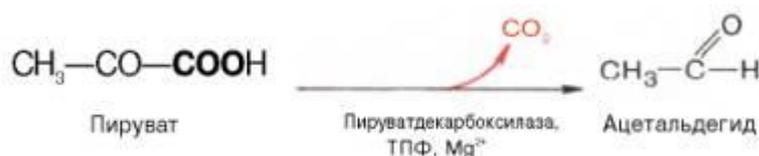


В итоге из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы этилового спирта и две молекулы углекислоты. Последовательность реакций спиртового брожения очень похожа на механизм анаэробного гликолиза. Сам по себе анаэробный гликолиз это сложный ферментативный процесс распада глюкозы, конечным продуктом которого является молочная кислота. Суммарное уравнение представляется следующим образом:



Конечная реакция анаэробного гликолиза протекает при участии фермента лактатдегидрогеназы и восстановленного NADH, в результате пируват восстанавливается в лактат. Различие между анаэробным гликолизом и спиртовым брожением начинается лишь после этапа образования пирувата. При спиртовом брожении конечный этап заменен двумя другими ферментативными реакциями: пируватдекарбоксилазной и алкогольдегидрогеназной. В присутствии микроорганизмов пируват вначале подвергается декарбоксилированию с образованием ацетальдегида. Данная реакция

протекает при участии фермента пируватдекарбоксилазы, для активации которого необходимы ионы Mg^{+2} :



Далее, образовавшийся ацетальдегид, при участии фермента алкогольдегидрогеназы и NADH, восстанавливается в этанол:



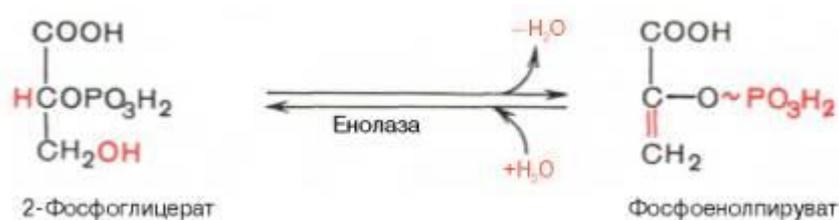
Конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и углекислота, а не молочная кислота как при гликолизе.

Таким образом, одним из главных составляющих посмертного новообразования этанола при гниении трупного материала, является процесс спиртового брожения углеводов, в частности глюкозы и глюкозных остатков гликогена. Так же можно отметить тот факт, что если смерть наступала на фоне предшествующего нервно-физического перенапряжения (стресса), например в условиях продолжительного аварийного полета, ДТП и т.п., при котором происходит значительный выброс углеводов в кровь, содержание глюкозы может достигать в крови уровня, сопоставимого гипергликемическому состоянию. Если определения глюкозы не проводилось в первые часы после смерти, а это бывает очень часто, то практически вся глюкоза при спиртовом брожении может трансформироваться в этанол.

Нами было проведено исследование по определению глюкозы и этанола с использованием вакутайнеров, содержащих натрия фторид (NaF) в качестве стабилизатора. Такие вакутайнеры используются в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, и поэтому имеют соответствующие сертификаты.

Как известно, NaF , является ингибитором фосфатаз, в частности изучено его ингибирующее действие на один из ключевых ферментов гликолиза - енолазу.

Енолаза (фосфопируватгидратаза, енолаза) - гликолитический фермент, катализирующий обратимую реакцию отщепления воды от 2-фосфоглицерата с образованием макроэргического соединения - фосфоенолпирувата:



Енолаза активируется ионами Mg^{+2} для осуществления взаимодействия фермента с субстратами. Замена ионов Mg^{+2} на ионы других металлов приводит к снижению ферментативной активности или к её полному исчезновению. Ионы фтора также ингибируют енолазу. В результате прерывается цепь реакций гликолиза и как следствие, механизм спиртового брожения.

При исследовании были получены следующие результаты на примере одного случая: труп мужчины гр-на Г., 1952 г.р., из обстоятельств дела: злоупотреблял спиртными напитками, сахарный диабет II типа инсулин-потребный. Состоял на учете у эндокринолога с февраля 2008 года. Поступил в больницу в 8:30 3 октября 2009 года, глюкоза при поступлении - 50,7 ммоль/л. Оказывались лечебные мероприятия. В 12:00 глюкоза - 34 ммоль/л. Умер в 17:00 3 октября. Находился в лечебном учреждении около 8-9 часов. Вскрытие и забор объектов 6 октября в 11:30. Объекты (кровь) помещались как в обычные пробирки, так и в вакутайнеры, содержащие NaF. Далее проводилось количественное определение глюкозы (глюкозооксидазный метод) и количественное определение этанола (метод газовой хроматографии) в различные временные интервалы. Опытные данные приведены в таблице:

Объекты Время	Кровь в пробирке (глюкоза) Ммоль/л	Кровь в вакутайнере (глюкоза) Ммоль/л	Кровь в пробирке (алкоголь) ‰	Кровь в вакутайнере (алкоголь) ‰
Через 0 часов после вскрытия	4,8	4,8	Этанол - 0 и-пропанол - 0,03	Этанол - 0 и-пропанол - 0,03
Через 4 часа после вскрытия	2,3	4,8		
Через 24 часа после вскрытия (сутки)	0,4	4,8		
Через 72 часа после вскрытия (3 суток)	0,2	4,8		
Через 192 часа после вскрытия (8 суток)	0,1	4,8		
Через 312 часов после вскрытия (13 суток)	0,1	4,8		
Через 480 часов после вскрытия (20 суток)	0	4,8		
Через 575 часов после вскрытия (24 суток)	0	4,5	Этанол - 0,5 и-пропанол - 0,14	Этанол - 0,03 и-пропанол - 0,08

Как видно из таблицы, уже через 4 часа после забора биологического материала в обычных условиях (в пробирке) уровень глюкозы снизился в два раза, а через сутки глюкоза почти полностью исчезла, в то время как кровь, находящаяся в вакутайнере сохраняла уровень глюкозы почти в месячный срок. Содержание этанола в объекте в

обычных условиях (в пробирке) выросло до 0,5‰, а в вакутайнере значительный рост этанола не отмечался. В общей сложности было проведено несколько таких исследований. И все результаты, по сути, были аналогичны вышеуказанному случаю.

Как было отмечено выше, при спиртовом брожении из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы этанола. Зная молекулярные массы исходного вещества и продукта, а также начальную концентрацию глюкозы в объекте, то можно рассчитать предположительную концентрацию этанола, образовавшегося при спиртовом брожении. В нашем случае начальная концентрация глюкозы в крови составляла - 4,8 ммоль/л, молекулярные массы глюкозы и этанола составляют 180,16 и 46,07 соответственно. Отсюда выходит, что 1 ммоль глюкозы = 0,18016 грамм, а 1 ммоль этанола = 0,04607 грамм. Исходя из следующих пропорций:

1 ммоль глюкозы — 2 ммоль этанола

4,8 ммоль/л глюкозы трупной крови — $X = 9,6$ ммоль/л этанола

и

1 ммоль/л этанола — 0,04607 г/л этанола

9,6 ммоль/л этанола — $X = 0,442272$ г/л (или 0,44‰)

В итоге теоретически должна была получиться концентрация этанола в трупной крови 0,44‰ из 4,8 ммоль/л глюкозы. На практике концентрация этанола составила 0,5‰. С учетом некоторых погрешностей при пробоподготовке данные результаты вполне сопоставимы.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что использование вакутайнеров позволяет предотвратить спиртовое брожение и сохранить первоначальный уровень глюкозы в трупной крови и тем самым исключить получение ложных результатов.

Литература:

1. «Биохимия и молекулярная биология» В.Эллиот, Д.Эллиот (изд. Москва, МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002 г.)
2. «Биологическая химия» Т.Т.Березов, Б.Ф.Коровкин (изд. Москва «Медицина», 1998 г.)
3. «Наглядная биохимия» Кольман Я., Рём К.-Г. (изд. Москва «Мир», 2000 г.)
4. «Действие терпеноидов на физиолого-биохимическую активность грибов-деструкторов промышленных материалов» В.Ф. Смирнов, Д.А. Кузьмин, О.Н. Смирнова, А.Н. Трофимов (изд. «Химия растительного сырья», 2002, №4, стр. 29-33, УДК 577.1)
5. «Микробиология» М.В.Гусев, Л.А.Минеева (изд. Московского университета, 1992 г.)