



GLYCOCORTICOSTEROIDS AND KETONE BODIES AS MARKERS OF DEATH FROM HYPOTHERMIA

Krzysztof BAŃKA, Grzegorz TERESIŃSKI, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

Abstract

Concentrations of cortisol, cortisone, corticosterone, ethanol, acetone and β -hydroxybutyric acid (β -HBA) were determined in autopsy blood samples collected from 10 individuals, using methods developed earlier. In all cases, circumstances of death were suggestive of excessive cooling. The examined individuals were alcoholics; before death, all of them, except one, had been intoxicated with an ethanol level above 2 g/l. The control group consisted of blood samples from deceased persons who had died after short death throes due to road traffic accidents or hangings – the above mentioned substances were determined in these blood samples. High β -HBA concentrations were observed in the experimental group (free acetone, considered a marker of death due to excessive cooling, was not elevated). Moreover, levels of hormones (cortisol, in particular) in individuals who died due to hypothermia were significantly ($p < 0.025$) higher than in posttraumatic death cases. Low environmental temperature increases the secretion of glycocorticosteroids (particularly cortisol) in intoxicated individuals and alcoholics. Thus, adrenal cortex hormones and β -HBA are more universal markers of hypothermia than levels of acetonemia recorded during routine ethanol determinations using gas chromatography.

Key words

Glycocorticosteroids; Ketone bodies; Ethanol; Death from hypothermia.

Received 20 June 2008; accepted 30 June 2008

1. Introduction

The weak and ambiguous nature of the morphological changes attributed to death from excessive cooling makes it necessary to search for other markers, e.g. biochemical markers, which are reproducible in the case of the action of this external factor. Recent research has indicated [4, 8, 15] that ketone bodies, particularly β -hydroxybutyric acid (β -HBA), can be one of the markers of death caused by hypothermia. Ketogenesis, which accompanies hypothermia, is also connected to processes undergoing hormonal regulation. For one of the organism's reactions to hypothermia is generation of mechanisms intensively producing heat through shivering thermogenesis. Another reaction of the body is non-shivering thermogenesis, which con-

sists in releasing reserves of energetic compounds and redirecting tissue catabolism to glucose saving processes, e.g. through secretion of glycocorticosteroids, since they stimulate gluconeogenesis (thereby causing catabolism of proteins), increase lipolysis and stimulate generation of ketone bodies, which migrate through cell membranes, constituting an easily assimilable energetic substrate when there is a glucose deficiency due to its utilisation in the process of shivering thermogenesis [11, 13].

Up to now, ketonemia has been investigated in humans in connection with diagnosis of deaths caused by excessive cooling [5, 9, 15, 16, 17]. The results of these studies have confirmed the diagnostic usefulness of ketone bodies determination (acetone, and particularly β -HBA). The influence of hormonal regulation

on the process of ketogenesis accompanying hypothermia has not been carefully studied. From the literature it is only known that in a state of hypothermia in humans, the concentration of cortisol (a glucocorticosteroid secreted by the fascicular zone of the adrenal cortex) in blood increases [14].

Alcohol is an important factor constituting the cause of sudden death in various cases, including deaths from hypothermia. According to data for years 1999–2004 (compiled by the Polish Police Headquarters) relating to deaths caused by excessive cooling, nearly 50% of deceased persons were individuals addicted to alcohol (consuming alcohol constantly) or persons who abused alcohol directly before death. Particular diagnostic problems are encountered in establishing a causal link between death and excessive cooling of the body of intoxicated individuals. In such cases alcohol decreases the duration of death throes, which may not lead to the occurrence of morphological changes and biochemical disorders that are encountered in sober individuals who have died due to extensive cooling of the body [10, 15, 16]. For alcohol dilates peripheral vessels and causes rapid hypothermia. Furthermore, it is known that alcohol causes disturbance of carbohydrate metabolism in the body through the inhibition of glucose production from non-carbohydrate sources – gluconeogenesis (due to an insufficiency of reaction substrate, i.e. pyruvate, which is reduced by an excess of NADH to lactate), as well as -oxidation of free fatty acids [1, 2, 6, 7, 14]. Therefore, there is an insufficiency of energetic material for shivering thermogenesis and thus excessive cooling takes place faster. The aim of this study was to establish whether hypothermia has any influence on corticosterone, cortisone and cortisol concentrations and to compare the usefulness of determination of these hormones in relation to previously studied ketone bodies, particularly in individuals who at the time of death were under the influence of alcohol.

2. Material

10 blood samples were collected from femoral veins of deceased individuals who had died in circumstances indicating excessive cooling (all of them turned out to be alcoholics, and – except one person – were intoxicated with an ethanol concentration above 2 g/l). The control group was made up of 10 individuals who had died (at the scene of the incident) from hanging or in a road accident. The collected material was stored at -70°C .

The death circumstances were established thanks to information available from the prosecutor's office and relatives of the deceased. Based on this, in the control group, the following diseases were excluded: alcoholism, diabetes, hypothermia and drug addiction. On the basis of *post-mortem* analysis, the concentration of ethanol and its congeners in this group was determined, and the influence of substances acting similarly to alcohol was ruled out.

3. Methods and instrumentation

Glycocorticosteroids (cortisol, cortisone, corticosterone) were determined by the method previously developed by the authors [3], utilising a Thermo Finnigan Surveyor liquid chromatograph coupled to an LCQ Advantage Max atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) ion trap mass spectrometer (Finnigan, San Jose, USA). -HBA was determined by a method which was previously developed by the authors [4] with application of a gas chromatograph (Thermo Finnigan Trace Ultra) coupled to an electron impact (EI) quadrupole mass detector (Thermo Finnigan DSQ). Analysis of acetone and ethanol in post-mortem blood was performed by the widely used technique of static head space analysis utilising a Fisons 8160 gas chromatograph (Fisons Instruments, Milan, Italy) with an FID detector and a Thermo Finnigan HS 2000 autosampler.

The results of the determinations were statistically evaluated by Mann-Whitney U and Kolmogorov-Smirnov non-parametric tests.

4. Results and discussion

Results of the determinations (median, ranges of quartiles 25–75%) together with results of statistical analysis are presented in Table I. It was found that the concentrations of glycocorticosteroids, particularly cortisone, were statistically higher in individuals with extensive cooling ($p < 0.01$ and $p < 0.025$) than in individuals who died after short death throes as a result of severe injuries or hanging (Figure 1, 2, 3).

In the studied group, the concentrations of acetone were significantly higher ($p < 0.02$ and $p < 0.05$) than in the control group, but only in one case did this concentration reach a level of 6845 mol/l, i.e. exceeded the maximum (250 mol/l) which is found in healthy living individuals. However, -HBA concentration in the studied group was statistically significantly higher ($p < 0.025$ and $p < 0.025$) than in the control group, and

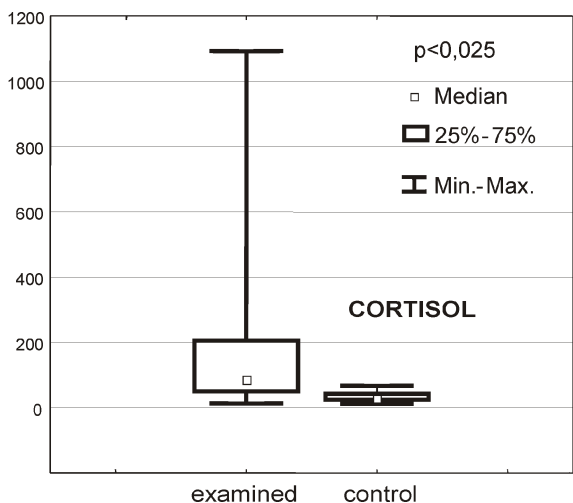


Fig. 1. The comparison of blood cortisol concentrations [ng/ml] in studied group and controls.

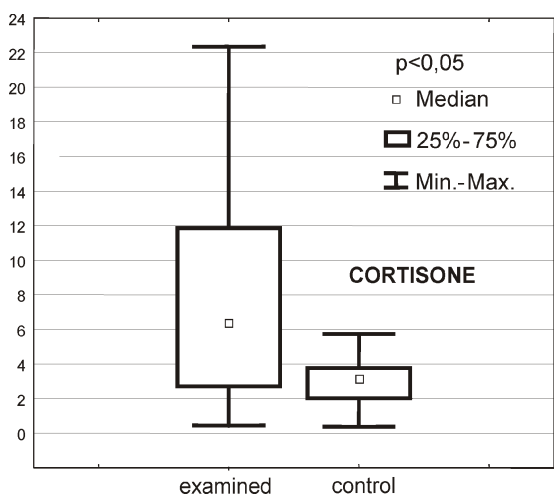


Fig. 2. The comparison of blood cortisone concentrations [ng/ml] in studied group and controls.

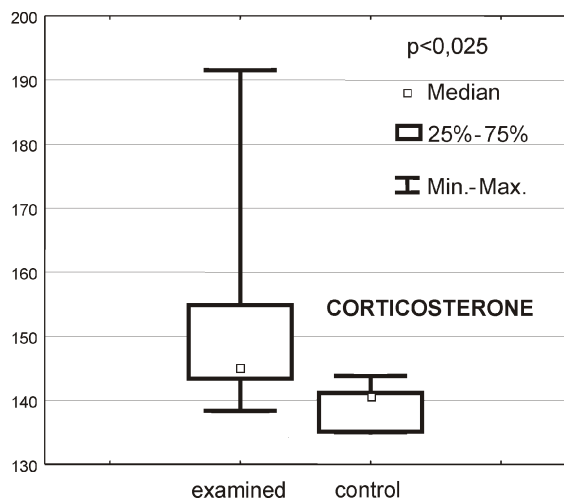


Fig. 3. The comparison of blood corticosterone concentrations [ng/ml] in studied group and controls.

TABLE I. THE RESULTS OF ETHANOL, ACETONE, -HYDROXYBUTYRATE, CORTISOL, CORTISONE, CORTICOSTERONE DETERMINATIONS IN POST-MORTEM BLOOD. IN ORDER TO HIGHLIGHT THE DIFFERENCES, THE EXTREME VALUES WERE EXCLUDED AND ONLY THOSE WITHIN 25%-75% WERE INCLUDED

Group	N	Ethanol		Acetone		-HBA		Cortisol		Cortisone		Corticosterone	
		BAC [g/l]	Range [g/l]	Median [μmol/l]	25-75% [μmol/l]	Median [μmol/l]	25-75% [μmol/l]	Median [ng/ml]	25-75% [ng/ml]	Median [ng/ml]	25-75% [ng/ml]	Median [ng/ml]	25-75% [ng/ml]
Examined	9	> 1.0	2.0-4.5	51	49-69	989	650-2402	109	83-207	7	4-12	153	143-155
Control	1	< 1.0	0.0	0	0-13	563	280-335	13	21-30	6	2-3	145	135-143
	4	> 1.0	2.4-2.7	0	0-13	313	251-349	24	27-42	3	1-5	139	139-141
	6	< 1.0	0.0	0	0-13	272		32		4		141	
Mann-Whitney test													
Kolmogorov-Smirnov test													

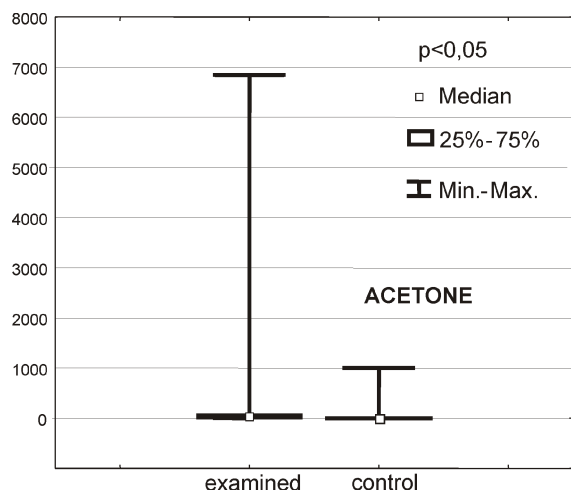


Fig. 4. The comparison of blood acetone concentrations [mol/l] in studied group and controls.

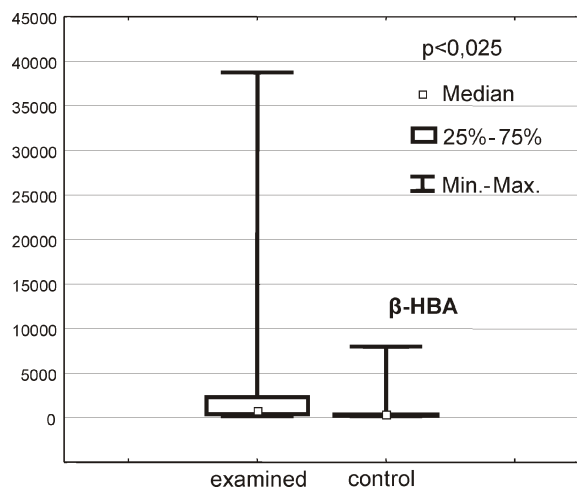


Fig. 5. The comparison of blood β -HBA concentrations [mol/l] in studied group and controls.

it exceeded the physiological level in all deceased persons (Figure 5). Thus, analysis of acetone and β -HBA concentrations confirms previous findings of authors concerning ketogenesis preceding death from hypothermia, which indicate that in individuals chronically abusing alcohol, severe ketonemia without significant acetonemia can occur, since the increase in the NADH/NAD ratio caused by ethanol metabolism above all stimulates production of β -HBA, which does not undergo conversion to acetone in these conditions [4]. Therefore, acetone determination may be useful for diagnosing excessive cooling, but only in cases where a state under the influence of alcohol or chronic abuse of alcohol are excluded.

The results of the performed study indicate that in alcoholics who have died due to excessive cooling of

the body, an increase in secretion of insulin-counteracting hormones (mainly cortisol) takes place. These hormones – besides mobilisation of glucose production mechanisms – cause excretion of fatty acids from adipocytes. This effect of glycocorticosteroids' action increases ketogenesis (through the inflow of free fatty acids to the liver), which ensures an energy source after complete consumption of the glycogen supply by the tissues (for intensive thermogenesis) [11, 14].

In the light of previous studies [4, 15, 16], the obtained results and their interpretation lead to the conclusion that in cases of excessive cooling, a blood specimen collected from a corpse is appropriate material not only for the determination of ketone bodies but also of glycocorticosteroids, and an increased level of the latter is probably a good marker of hypothermia.

5. Conclusions

1. In individuals chronically abusing alcohol, in a state of hypothermia, severe ketonemia may occur due to an increase only in β -HBA, without significant acetonemia.
2. Excessive cooling of the body increases secretion of glycocorticosteroids (particularly cortisol) in intoxicated individuals or alcoholics.
3. Therefore, determination of β -HBA and glycocorticosteroids concentrations may also be useful for diagnosing excessive cooling in cases of deaths of intoxicated individuals and alcohol abusers.

References

1. Ammon H. P. T., Estler C. J., Influence of acute and chronic administration of alcohol on carbohydrate breakdown and energy metabolism in the liver, *Nature* 1967, 216, 158–159.
2. Andersen K. L., Hellstrom B., Vogt Lorentzen F., Combined effect of cold and alcohol on heat balance in man, *Journal of Applied Physiology* 1963, 18, 975–998.
3. Bańka K., Buszewicz G., Teresiński G. [et al.], Cortisol, cortisone and corticosterone determination in biological materials by liquid chromatography mass spectrometry, *Problems of Forensic Sciences* 2008, 73, 44–52.
4. Buszewicz G., Teresiński G., Bańka K. [i in.], Ocena przydatności diagnostycznej współczynnika β -hydroksymaślan/aceton w sądowo-lekarskiej diagnostyce nagłych zgonów, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2007, 62, 289–293.
5. Brinkmann B., Fechner G., Karger B. [et al.], Ketoacidosis and lactic acidosis – frequent causes of death in

- chronic alcoholics?, *International Journal of Legal Medicine* 1998, 111, 115–119.
6. Field J. B., Williams H. E., Martimore G. E., Studies on the mechanism of ethanol-induced hypoglycemia, *The Journal Clinical Investigation* 1963, 42, 497–506.
 7. Fitzgerald F. T., Jessop C., Accidental hypothermia: a report of 22 cases and review of the literature, *Advances in Internal Medicine* 1982, 27, 128–150.
 8. Kanetake J., Kanawaku Y., Mimasaka S. [et al.], The relationship of a high level of serum beta-hydroxybutyrate to cause of death, *Legal Medicine*, 2005, 7, 169–174.
 9. Hanson P. G., Johnson R. E., Variation of plasma ketones and free fatty acids during acute cold exposure in man, *Journal of Applied Physiology* 1966, 20, 56–61.
 10. Hirvonen J., Necropsy findings in fatal hypothermia cases, *Forensic Science International* 1976, 8, 155–164.
 11. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. [i in.], *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995.
 12. Paakkonen T., Leppaluoto J., Cold exposure and hormonal secretion. A review, *International Journal of Circumpolar Health* 2002, 61, 265–276.
 13. Shephard R. J., Metabolic adaptations to exercise in the cold: an update, *Sports Medicine*, 1993, 16, 266–289.
 14. Stoner H. B., Frayn K. N., Little R. A. [et al.], Metabolic aspects of hypothermia in the elderly, *Clinical Science* 1980, 59, 19–27.
 15. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia, *Forensic Science International* 2002, 127, 88–96.
 16. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., Biochemical background of ethanol induced cold susceptibility, *Legal Medicine* 2005, 7, 15–23.
 17. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., Usefulness of β -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid and acetone determinations in blood, urine and vitreous humour for necrochemical diagnosis of premortal metabolic disorders, *Problems of Forensic Science* 2000, 44, 55–69.

Corresponding author

Krzysztof Bańka
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8
PL 20-090 Lublin
e-mail: krzysztofbanka@wp.pl

GLIKOKORTYKOSTERYDY ORAZ CIAŁA KETONOWE JAKO MARKERY ŚMIERCI Z WYCHŁODZENIA

1. Wstęp

Ubogi i niejednoznaczny charakter zmian morfologicznych przypisywanych śmierci z wychłodzenia powoduje konieczność poszukiwania innych markerów, np. biochemicznych, powtarzalnych w przypadkach zadziałania tego czynnika zewnętrznego. Dotychczasowe badania wykazały [4, 8, 15], że jednym z markerów śmierci z hipotermii mogą być ciała ketonowe, zwłaszcza kwas β -hydroksymasłowy (β -HBA). Ketogeneza towarzysząca hipotermii jest przy tym powiązana także z procesami podlegającymi regulacji hormonalnej. Jedną z reakcji organizmu na oziębienie jest bowiem wyzwalenie mechanizmów prowadzących do wzmożonej produkcji ciepła na drodze termogenezy drżeniowej. Inną reakcją organizmu jest termogeneza bezdrżeniowa, która polega na uruchomieniu zasobów związków energetycznych i przestawieniu katabolizmu tkankowego na procesy oszczędzające zużycie glukozy, np. przez sekrecję glikokortykosteroidów, gdyż pobudzają one glukoneogenezę (powodując tym samym katabolizm białek) oraz nasilają lipolizę i stymulują tworzenie ciał ketonowych, które swobodnie przechodzą przez błony komórkowe, stanowiąc łatwo przyswajalny substrat energetyczny wówczas, gdy występuje niedobór glukozy w związku z jej zużyciem przez mięśnie w procesie termogenezy drżeniowej [11, 13].

Jak dotąd, ketonemię badano u ludzi w związku z diagnostyką zgonów spowodowanych znacznym ochłodzeniem [5, 9, 15, 16, 17]. Wyniki tych badań potwierdziły przydatność diagnostyczną oznaczania ciał ketonowych (acetonu, a zwłaszcza β -HBA). Wpływem regulacji hormonalnej na przebieg ketogenezy towarzyszącej hipotermii nie zajmowano się bliżej. Z piśmiennictwa wiadomo jedynie, że u ludzi w stanie hipotermii dochodzi do podwyższenia stężenia kortyzolu we krwi, tj. glikokortykoidu wydzielanego przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy [14].

Alkohol jest ważnym czynnikiem stanowiącym przyczynę różnego rodzaju śmierci gwałtownych, także śmierci z powodu wychłodzenia. Według statystyk (prowadzonych przez Komendę Główną Policji) dotyczących zgonów z powodu nadmiernego wychłodzenia organizmu, w latach 1999–2004 blisko 50% spośród zmarłych to osoby uzależnione od alkoholu i spożywające go stale lub takie, które nadużywały alkoholu bezpośrednio przed śmiercią.

Szczególne trudności diagnostyczne sprawia ustalenie związku przyczynowego między zgonem a wyziębieniem ciała u osób nietrzeźwych, u których alkohol skraca czas agonii, w związku z czym może nie docho-

dzić u nich do powstania zmian morfologicznych i zaburzeń biochemicznych spotykanych u osób trzeźwych, umierających w następstwie wychłodzenia ciała [10, 15, 16]. Alkohol rozszerza bowiem naczynia obwodowe i powoduje szybką utratę ciepła. Wiadomo ponadto, że alkohol powoduje zaburzenia gospodarki węglowodanowej w organizmie przez hamowanie syntezy glukozy ze źródeł niewęglowodanowych – glukoneogenezę (z powodu braku substratu do tej reakcji – czyli pirogronianu, który jest redukowany przez nadmiar NADH do mleczanu) oraz β -oksydację wolnych kwasów tłuszczowych [1, 2, 6, 7, 14]. Brakuje zatem materiału energetycznego do termogenezy drżeniowej i dzięki temu szybciej następuje wychłodzenie.

Celem niniejszej pracy było ustalenie, czy hipotermia wpływa na poziom kortykosteronu, kortyzonu i kortyzolu oraz porównanie przydatności oznaczeń tych hormonów w porównaniu do przebadanych uprzednio ciał ketonowych, zwłaszcza u osób, które w chwili śmierci znajdowały się pod wpływem alkoholu.

2. Materiał

10 prób krwi pobrano z żył udowych zwłok osób, które zmarły w okolicznościach wskazujących na nadmierne wychłodzenie organizmu (wszyscy okazali się alkoholikami, którzy – z wyjątkiem 1 osoby – znajdowali się w stanie nietrzeźwości ze stężeniem etanolu powyżej 2 g/l). Grupę kontrolną stanowiło zaś 10 osób, które zmarły na miejscu zdarzenia w wyniku powieszenia lub wypadków drogowych. Pobrany materiał przechowywano w temperaturze -70°C .

Okoliczności zgonów określano dzięki informacjom udostępnionym przez prokuratury i rodziny osób zmarłych. W grupie kontrolnej na tej podstawie wykluczano: alkoholizm, cukrzycę, hipotermię i narkomanię. Na podstawie wyników badań pośmiertnych w tej grupie określano natomiast poziom etanolu i jego kongenerów oraz wykluczano wpływ środków działających podobnie do etanolu.

3. Metody i aparatura

Glikokortykosterydy (kortyzol, kortyzon, kortykosteron) oznaczano metodą wcześniej opracowaną przez autorów niniejszej pracy [3] przy użyciu chromatografu cieczowego Thermo Finningan Surveyor sprzężonego ze spektrometrem mas typu pułapka jonowa LCQ Advant-

age Max (Finningan, San Jose, Stany Zjednoczone) z zastosowaniem jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). -HBA oznaczano przy użyciu opracowanej przez autorów metody [4] za pomocą chromatografu gazowego (Thermo Finningan Tracu Ultra) sprzężonego z kwadrupolowym detektorem mas (Thermo Finningan DSQ) z zastosowaniem jonizacji elektronej (EI). Analizę acetonu i etanolu we krwi sekcyjnej wykonywano zaś powszechnie stosowaną techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (*headspace*) za pomocą chromatografu gazowego Fisons 8160 (Fisons Instruments, Milan, Włochy) z detektorem FID i dozownikiem Thermo Finningan HS 2000.

Wyniki oznaczeń poddano ocenie statystycznej za pomocą testów nieparametrycznych Manna-Whitneya U oraz Kolmogorova-Smirnova.

4. Wyniki badań i dyskusja wyników

Zestawienie rezultatów oznaczeń (pod postacią mediany oraz zakresów kwartyli 25–75%) oraz wyników analizy statystycznej zawiera tabela I.

Stwierdzono, że poziomy oznaczanych glikokortykosterydów, a szczególnie kortyzonu, były u osób wychłodzonych znamienne statystycznie wyższe ($p < 0,01$ i $p < 0,025$) niż u osób, które zmarły po krótkiej agonii w następstwie ciężkich obrażeń lub w wyniku powieszenia (rycina 1, 2, 3). W grupie badanej znamienne wyższe ($p < 0,02$ i $p < 0,05$) niż w grupie kontrolnej były także stężenia acetonu (rycina 4), ale tylko w jednym przypadku stężenie to osiągnęło poziom 6845 $\mu\text{mol/l}$, tj. przekroczyło maksimum (250 $\mu\text{mol/l}$) spotykane zażyłościowo u zdrowych osób. Natomiast podczas oznaczania

-HBA wykazano, że jego stężenie w grupie badanej było istotnie statystycznie wyższe ($p < 0,025$ i $p < 0,025$) niż w grupie kontrolnej i u wszystkich ofiar przekroczyło poziom fizjologiczny (rycina 5). Analiza poziomów acetonu i -HBA potwierdza więc wcześniejsze spostrzeżenia autorów dotyczące ketogenezy poprzedzającej śmierć z wychłodzenia, z których wynika, że u osób przewlekle nadużywających alkoholu może dochodzić do wysokiej ketonemii bez istotnej acetonemii, gdyż spowodowany metabolizmem etanolu wzrost indeksu NADH/NAD stymuluje tworzenie się przede wszystkim -HBA, który w tych warunkach nie ulega konwersji do acetonu [4]. Oznaczanie acetonu może być zatem użyteczne do diagnozowania nadmiernego wychłodzenia, ale tylko w przypadku, gdy wykluczy się stan nietrzeźwości i przewlekle nadużywanie alkoholu.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że u alkoholików, którzy zmarli w wyniku nadmiernego wychłodzenia organizmu, dochodzi do wzrostu sekrecji hormonów przeciwstawnych do insuliny (głównie kortyzolu), które – oprócz mobilizacji mechanizmów gluko-

zotwórczych – powodują uwalnianie kwasów tłuszczowych z adipocytów. Ten efekt oddziaływania glikokortykosterydów zwiększa zaś ketogenezę (przez napływ wolnych kwasów tłuszczowych do wątroby), co po zużyciu przez tkanki zapasów glikogenu (na wzmożoną termogenezę), zapewnia im źródło energii [11, 14].

W świetle wcześniejszych prac [4, 15, 16], uzyskane wyniki oraz ich interpretacja prowadzą do wniosku, że w przypadkach, gdy zachodzi podejrzenie nadmiernego wychłodzenia organizmu, krew pobrana ze zwłok stanowi dobry materiał nie tylko do oznaczania ciał ketonowych, ale również glikokortykosterydów, których podwyższony poziom jest prawdopodobnie dobrym markerem hipotermii.

5. Wnioski

1. U osób przewlekle nadużywających alkoholu, w stanach hipotermii, może dochodzić do wysokiej ketonemii wywołanej wzrostem stężenia wyłącznie kwasu -HBA bez istotnej acetonemii.
2. Wychładzanie organizmu zwiększa sekrecję glikokortykosterydów (zwłaszcza kortyzolu) u osób nietrzeźwych i alkoholików.
3. Oznaczanie stężenia kwasu -HBA i glikokortykosterydów może być zatem użyteczne do diagnozowania nadmiernego wychłodzenia również w przypadkach zgonów osób nietrzeźwych i przewlekle nadużywających alkoholu.