

УДК 340.6:616-001-091.5-074:54-43

A.B. Kісь

Харківське обласне бюро судово-медичної експертизи

ВИЗНАЧЕННЯ ПРИЖИТТЕВИХ І ПОСТМОРТАЛЬНИХ ОЗНАК УШКОДЖЕННЯ М'ЯКИХ ТКАНИН ВНАСЛІДОК ТУПОЇ ТРАВМИ ІНДИКАТОРНИМ МЕТОДОМ

Показано можливості використання тетразолію нітросинього для макроскопічної гістохімічної диференціації прижиттєвих і постмортальних ушкоджень м'яких тканин у ході проведення судово-медичної експертизи трупів. Візуальні результати підтверджено змінами оптичної щільноти гомогенату тканин після експозиції його у розчині тетразолію нітросинього (n-HCT). Отримані результати свідчать про умови та можливість практичного використання індикаторної реакції із n-HCT для встановлення за- життєвого або посмертного характеру травматичних змін.

Ключові слова: судово-медична експертиза, труп, гістохімія, ушкодження, тетразолій.

Найбільш частою причиною механічного ушкодження м'яких тканин є тупа травма. При встановленні прижиттєвості і давності заподіяння механічних ушкоджень труднощі виникають у випадках, коли травма виникла безпосередньо після смерті, коли тканини ще зберігають свою життезадатність, або незадовго до її настання [1].

Зміни в зоні травм, які виникли в ранньому анте- та постмортальному періодах, досить добре вивчені біохімічним методом, але в повсякденній експертній роботі цей метод не знайшов широкого застосування [2, 3]. Нетривалість періоду від травматизації до настання смерті (або наявність ранніх посмертних ушкоджень) обумовлює складність і суб'єктивність експертного трактування давності й прижиттєвості ушкоджень [4].

Незважаючи на численні дослідження з даної проблеми та використання при цьому найсучасніших методів, поки що запропоновано мало рекомендацій, придатних для широкого впровадження в повсякденну практику [5–7]. Питання про час утворення ушкоджень зберігає актуальність і, безсумнівно, вимагає подальшого глибокого вивчення і виявлення нових експертних критеріїв.

Метою дослідження було визначити ознаки прижиттєвості й давності ушкоджень м'я-

ких тканин внаслідок тупої механічної травми індикаторним методом залежно від зовнішнього температурного фактора із застосуванням тетразолію нітросинього (n-HCT).

Матеріал і методи. Експеримент проведений на щурах лінії Вістар масою 250–300 г. Піддослідних тварин витримували на звичайному харчовому рационі з вільним доступом до води з дотриманням вимог національних «Загальних етических принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» [8]. Тварин виводили з експерименту шляхом миттєвої дислокації після ін'екції кетаміну 5 мг/кг у хвостову вену. В роботі використано мінімально допустиму для статистичної обробки і отримання достовірних результатів загальноприйняту кількість тварин – по 8 у кожній групі. Експериментальних груп було шість, контрольна (інтактні тварини) – одна.

Механічну травму задніх кінцівок відтворювали за допомогою пристрою для експериментального моделювання політравми [9].

Зразки тканини забирали після нанесення тупої травми (прижиттєво й відразу після миттєвої транслокації): у тварин 1-ї групи –

© A.B. Kісь, 2012

відразу після травмування; 2-ї – через 0,5 год; 3-ї – через 1 год; 4-ї – через 2 год; 5-ї – через 4 год; 6-ї – через 6 год після травмування; 7-ма група – інтактні тварини. Усі зразки після вилучення витримували при температурі +18, -10 та +37 °C протягом 1 год.

Макроскопічна проба (якісна реакція) на ішемічно-некротичні зміни у зоні травматичних ушкоджень проведена із застосуванням індикатора – 1 – 2%-вого n-HCT і за допомогою реакційної суміші, що містить НАД. Смужку тканини поміщали в чашку Петрі, заливали розчином реактиву та залишали на 10 хв в терmostаті при 37 °C. Інтенсивність реакції забарвлення оцінювали за принципом Астальді, який заснований на виявленні ступеня інтенсивності специфічного забарвлення ушкоджених тканин і є якісною реакцією.

Ступінь ушкодження м'яких тканин оцінювали спектрофотометрично: м'язи гомогенізували у розчині сахарози з фосфатним буфером – 1 мл гомогенату додавали до 1 мл 0,1%-вого n-HCT (та реакційної суміші), перемішували і поміщали на водяну баню при 40 °C на 20 хв. До кожного зразка додавали 400 мкл ацетону, потім перемішували і поміщали при 20 °C протягом 15 хв для вилучення забарвленого формазаном гомогенату. Потім зразки центрифугували при 50 с⁻¹ при +4 °C протягом 30 хв. Прозорий блакитний супернатант зливали і вимірювали абсорбцію при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі Multiskan EX 355 (Labsystems, Фінляндія).

При обробці результатів використані методи параметричної статистики [10].

Результати та їх обговорення. Дослідження показало, що після інкубації локусу м'яза при 37 °C протягом 10 хв зона некротичного ураження не забарвлюється, а нешкоджені тканини інтенсивно забарвлюються у фіолетовий колір за рахунок поглинання n-HCT життєздатними клітинами й під впливом їх дегідрогеназної системи відновлюються.

Так, виявлені ділянки травматичного ушкодження світліші за інтактний м'яз, причому ступінь забарвлення залежить від часу після проведення експерименту й температурного режиму. Демаркаційна лінія при прижиттєвому травматичному ушкодженні (рис. 1) й лінія розмежування при постмортальному травматичному ушкодженні для об'єкта, що зберігається при низькій температурі (-10 °C), чітко виявляється вже через 1 год після тупої травми й спостерігається протягом 2 год після травми в усіх випадках незалежно від часу зберігання об'єкта (рис. 2).

Зіставлення досліджених зразків показало, що при +18 °C з часом зона некротичного ураження збільшується, інтенсивність забарвлення зменшується, з'являється можливість диференціювати прижиттєво ушкоджену ділянку тканини (рис. 3) і постмортальне травматичне ушкодження (рис. 4) в залежності від часу після нанесення травми.

Подібна індикаторна реакція із зонами розмежування ушкодженої та інтактної ділянок була зафіксована при визначені прижиттєвого (рис. 5) й постмортального травматичного ушкодження м'язів при витримуванні зразків при +37 °C, але інтенсивність забарв-

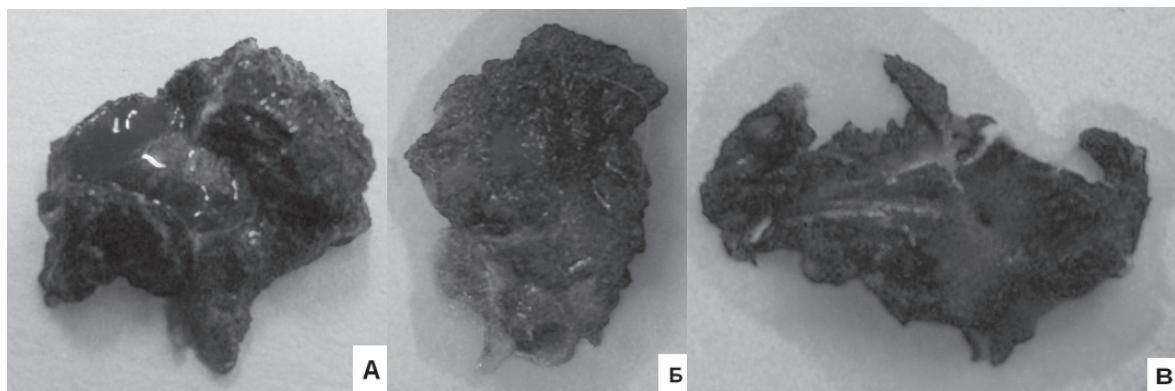


Рис. 1. Ділянка прижиттєвого ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при -10 °C через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим n-HCT на 5-ту хвилину після терmostатування

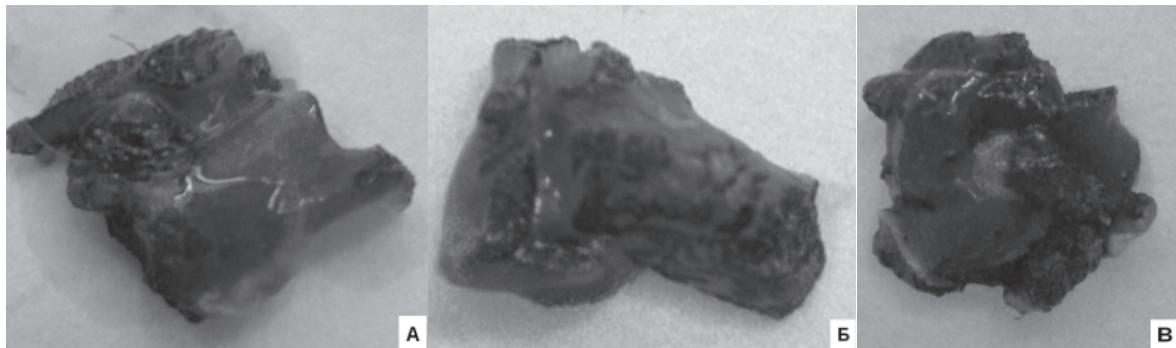


Рис. 2. Ділянка постмортального ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при -10°C через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим н-НСТ на 5-ту хвилину термостатування

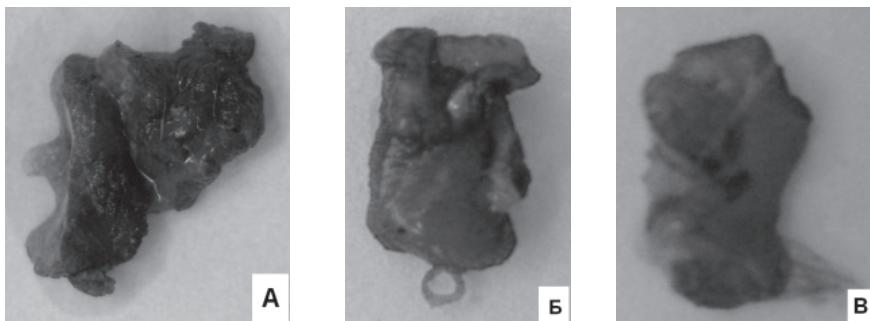


Рис. 3. Ділянка прижиттєвого ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при $+18^{\circ}\text{C}$ через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим н-НСТ на 5-ту хвилину термостатування

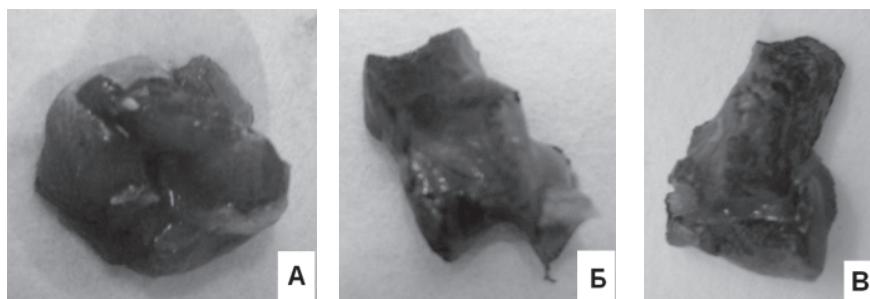


Рис. 4. Ділянка постмортального ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при $+18^{\circ}\text{C}$ через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим н-НСТ на 5-ту хвилину термостатування

лення була досить низькою, особливо вже через 2 год (рис. 6).

У зв'язку із вказаним було проведено спектрофотометричне дослідження гомогенату м'язів експериментальних тварин з реакційною сумішшю для кількісної оцінки динаміки показників прижиттєвого й постмортального механічного ушкодження. Візуалізація індикаторної реакції показала інтенсивне забарвлення у пробірках із зразками гомогенату ділянок м'яких тканин при прижиттєвому тупому механічному ушкодженні

через 30 хв зберігання при $+18^{\circ}\text{C}$ (рис. 7, А) та -10°C (рис. 7, В). При постмортальному тупому механічному ушкодженні через 30 хв зберігання при -10°C (рис. 7, Б) та $+18^{\circ}\text{C}$ (рис. 7, Г) забарвлення н-НСТ зовсім не спостерігалося.

При спектрофотометричному дослідженні гомогенізованих тканин встановлено зниження оптичної щільності як прижиттєвих, так і постмортальних травматичних ушкоджень у порівнянні з інтактними тканинами незалежно від температурного режиму та ча-

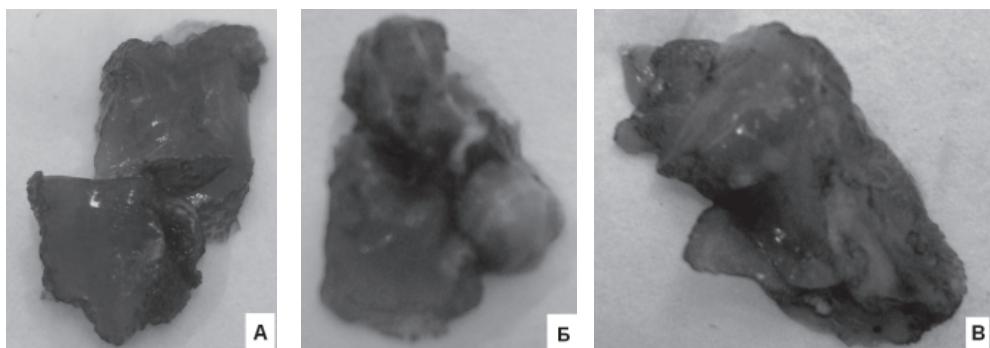


Рис. 5. Ділянка прижиттєвого ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при $+37^{\circ}\text{C}$ через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим н-НСТ на 5-ту хвилину термостатування

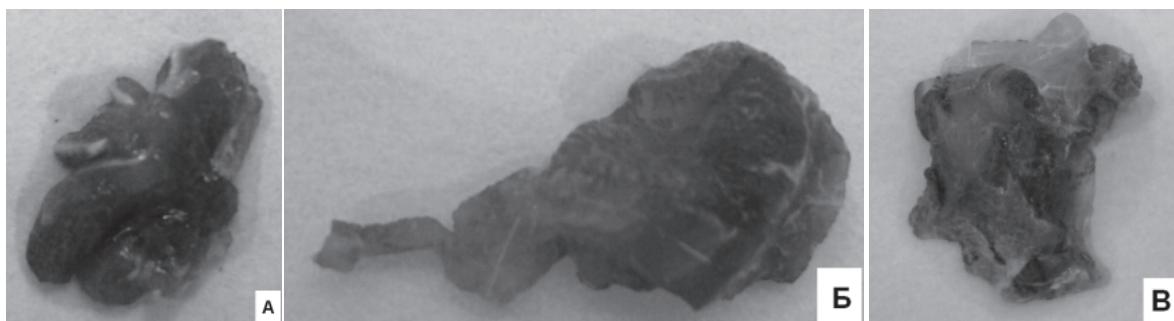


Рис. 6. Ділянка постмортального ушкодження тканин внаслідок механічного тупого травмування при $+37^{\circ}\text{C}$ через 30 хв (А), 1 год (Б), 2 год (В) після травми.

Інтенсивність забарвлення 1%-вим н-НСТ на 5-ту хвилину термостатування

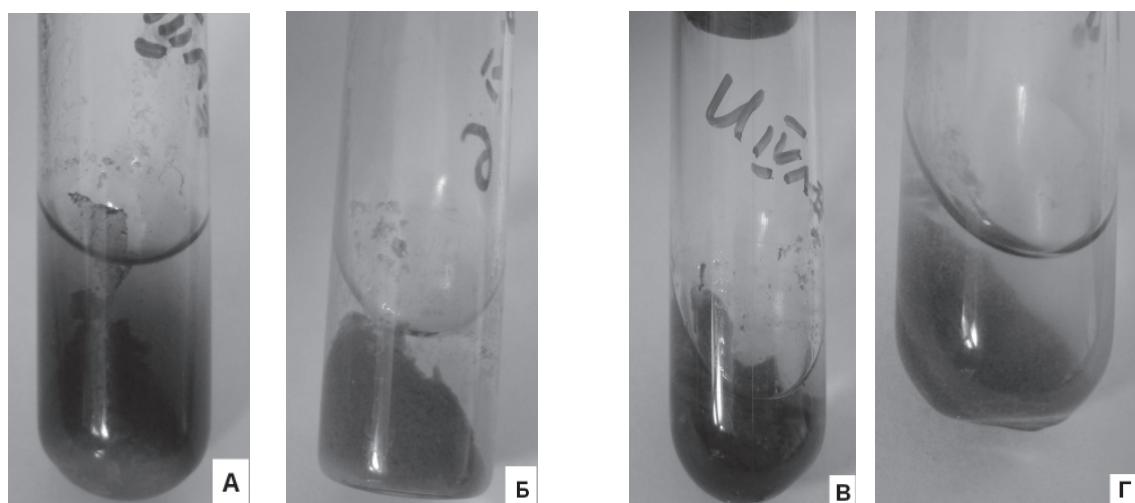


Рис. 7. Інтенсивність забарвлення гомогенату реакційною сумішшю з 0,1%-вим н-НСТ і ферментом – каталізатором β -НАД через 30 хв після травми:

А – гомогенат ділянки м'яких тканин при прижиттєвому тупому механічному ушкодженні при -10°C ; Б – при постмортальному тупому механічному ушкодженні при -10°C ; В – при прижиттєвому тупому механічному ушкодженні при $+18^{\circ}\text{C}$; Г – при постмортальному тупому механічному ушкодженні при $+18^{\circ}\text{C}$

су після нанесення травми. Але при зіставлennі результатів, здобутих при різних температурних режимах, встановлено підвищення показників оптичної щільності при -10°C

(рис. 8) й зниження показників оптичної щільності гомогенату м'язів при прижиттєвому та постмортальному механічному ушкодженні при $+37^{\circ}\text{C}$.

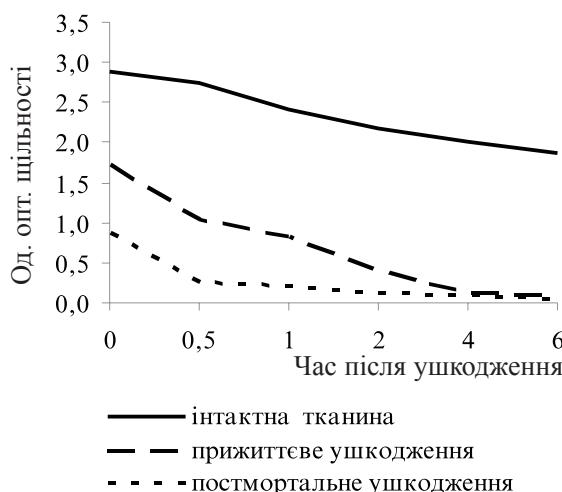


Рис. 8. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при прижиттєвому та постмортальному механічному ушкодженні залежно від часу та температурного режиму ($t = -10^{\circ}\text{C}$) при застосуванні індикаторної суміші з 0,1%-вим n-HСТ + β -НАД

Результати визначення оптичної щільності зразків гомогенату при травматичному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні після терmostатування тканин при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 1 год показали, що цей показник нижче за здобутий при -10 та $+18^{\circ}\text{C}$ (рис. 9), що свідчить про тотальне некротичне ураження м'язів під впливом підвищеної температури як при постмортальному, так і при прижиттє-

вому ушкодженні порівняно з інтактними тканинами. При дослідженні оптичної щільності гомогенату м'язів залежно від проміжку часу було встановлено, що при прижиттевому механічному ушкодженні показники оптичної щільності гомогенату підвищені порівняно з такими при постмортальному механічному ушкодженні.

Така ж тенденція спостерігається при дослідженні гомогенату ушкоджених тканин під впливом підвищеної температури ($+37^{\circ}\text{C}$): оптична щільність гомогенату при прижиттевому механічному ушкодженні у 2 рази вища, ніж при постмортальному, й у 3,6 раза нижче, ніж інтактних тканин у часовому проміжку 30 хв (рис. 10). Подібна картина спостерігається при дослідженні оптичної щільності гомогенату м'язів при механічному прижиттевому та постмортальному ушкодженні після заморожування дослідної ділянки: відмічається збільшення показників оптичної щільності при прижиттевому механічному ушкодженні порівняно з постмортальними показниками у 1,5 раза й зниження цих параметрів у 1,7 раза порівняно з інтактними тканинами.

Таким чином, проведене дослідження показало, що застосування індикаторного методу з n-HСТ є доцільним у судово- медичній експрес-діагностиці, і розробка комплексних



Рис. 9. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при прижиттєвому та постмортальному механічному ушкодженні залежно від часу та температурного режиму ($t = +18^{\circ}\text{C}$) при застосуванні індикаторної суміші з 0,1%-вим n-HСТ + β -НАД

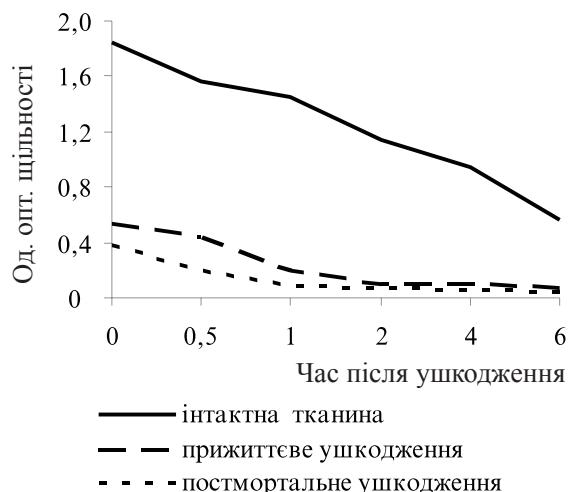


Рис. 10. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при прижиттєвому та постмортальному механічному ушкодженні залежно від часу та температурного режиму ($t = +37^{\circ}\text{C}$) при застосуванні індикаторної суміші з 0,1%-вим n-HСТ + β -НАД

алгоритмів із застосуванням індикаторних методів потребує подальшого вивчення.

Висновки

Отримані результати дозволяють розширити арсенал засобів судово-медичного визначення прижиттєвості і давності травми, показують можливості використання сучасних індикаторних методів у судово-медичній прак-

тиці. Застосування експрес-методу із використанням тетразолію нітросинього (n-NCT) при проведенні судово-медичної експертизи трупа дозволяє об'єктивно і достовірно розрізняти прижиттєві та посмертні ушкодження і давність заподіяння механічної травми в антемортальному періоді у часовому проміжку до шести годин від настання смерті.

Список літератури

1. Богомолов Д. В. Проблемы, нуждающиеся в ускоренной разработке / Д. В. Богомолов // Вестник суд.-мед. службы. – 2006. – № 3. – С. 12–14.
2. Лаптева М. И. Судебно-медицинское установление давности тупой механической травмы мягких тканей (морфометрическое исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.24 / М. И. Лаптева. – М., 2007. – 16 с.
3. Султанов Р. М. Судебно-медицинская диагностика прижизненности повреждений мышечной ткани на гнилостно измененных трупах. Судебно-медицинская экспертиза механических повреждений: Республ. сб. научн. тр. – М., 1988. – С. 110–111.
4. Эделев Н. С. К вопросу о прижизненности механических повреждений : матер. VI Всероссийск. съезда судебных медиков, посвященного 30-летию Всероссийского общества судебных медиков / Н. С. Эделев, В. Г. Воробьев, Е. Б. Логвинова. – Москва–Тюмень, 2005. – С. 310.
5. Пикулева М. В. Особенности диагностики прижизненности и давности причинения механических повреждений / М. В. Пикулева, О. Ю. Берг, Ю. С. Исаев // Publication in electronic media: 24.05.2009 under <http://journal.forens-lit.ru/node/42> Publication in print media: Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – Барнаул–Новосибирск, 2008. – Вып. 14.
6. Пат. № 14411 U, UA, МПК A61B 5/05, G01N 33/483. Способ визначення давності настання смерті шляхом дослідження біофізичних властивостей тканини трупа / Мішалов В. Д., Бурчинський В. Г., Хохолєва Т. В., Войченко В. В., Сулоєв К. М., Федченко М. М., Бабкіна О.П. – № u200510902 ; Заявл. 17.11.05 ; Опубл. 15.05.06, Бюл. №
7. Халиков А. А. Состояние и перспективы проблемы определения прижизненности и давности механических повреждений / А. А. Халиков, А. Ю. Вавилов, С. В. Хасанянова // Проблемы экспертизы в медицине. – 2005. – Т. 5, № 17–1. – С. 36–40.
8. European Convention for the protection of vertebratae animals used for experemental and other scientific purposes // Strasbourg. Counsil Treaty Series. – 1986. – № 123. – 52 р.
9. Пат. 6548 Україна, МПК 7 G09B23/28, A61B17/00. Пристрій для відтворювання політравми / Замятін П. М., Каплін Г. І., Чернов О. Л. – Заявл. 27.09.04 ; Опубл. 16.05.05, Бюл. № 5.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.

A.B. Кись

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ И ПОСТМОРТАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ ТУПОЙ ТРАВМЫ ИНДИКАТОРНЫМ МЕТОДОМ

Показана возможность использования тетразолия нитросинего для макроскопической гистохимической дифференциации прижизненных и постмортальных повреждений мягких тканей в ходе проведения судебно-медицинской экспертизы трупов. Визуальные трансформации подтверждены изменениями оптической плотности гомогената тканей после экспозиции его в растворе тетразолия нитросинего (n-NBT). Полученные результаты свидетельствуют об условиях и возможности практического использования индикаторной реакции с n-NBT для установления прижизненного или посмертного характера травматических изменений.

Ключевые слова: судебно-медицинская экспертиза, труп, гистохимия, повреждение, тетразолий.

A.V. Kiss

DETERMINATION CHARACTERISTICS VITALITY AND POSTMORTEM DAMAGE TO THE SOFT TISSUE DUE TO BLUNT TRAUMA TO THE INDICATOR METHOD

The possibility of using nitroblue tetrazolium for macroscopic histochemical differentiation antemortem and postmortem soft tissue injuries during the forensic examination of corpses. Visual transformation are confirmed by changes optical density of tissue homogenate after exposure in a solution of nitroblue tetrazolium (n-NBT). These results provide evidence of conditions and possibilities of practical use of the indicator reaction with n-NBT for differentiation of intravital and postmortem traumatic change.

Key words: *forensic pathology, corpse, histochemistry, damage, tetrazolium.*

Поступила 10.08.12