

ЗАСТОСУВАННЯ ІНДИКАТОРНОГО МЕТОДУ В ЯКОСТІ СУДОВО-МЕДИЧНОЇ ЕКСПРЕС- ДІАГНОСТИКИ ІШЕМІЧНИХ ПРИЖИТТЄВИХ І ПОСТМОРТАЛЬНИХ УРАЖЕНЬ М'ЯЗІВ

А.В.Кісь

Харківське обласне бюро судово-медичної експертизи

Вступ

У судово-медичній практиці зустрічаються випадки, коли в інтересах слідства і суду необхідно вирішувати питання, які пов'язані з диференціальною діагностикою прижиттєвих і посмертних ушкоджень. На вирішення експерта завжди ставляться питання про прижиттєвість і терміни формування ішемічних ушкоджень. Діагностика ішемічного процесу в тканинах має значення не тільки для встановлення факту механічного впливу на тіло людини, але й для вирішення інших спеціальних питань і полягає у встановленні строків давності формування ішемії. У частині випадків представляється можливим відрізнити прижиттєві ушкодження від посмертних. Але, якщо ішемічні ушкодження нанесені незадовго до настання смерті, то вирішення цього питання є складним.

На сьогодні немає чітких критеріїв, що дозволяють об'єктивно, надійно, з високою ймовірністю визначати прижиттєвість і давність ушкоджень, які виникли у ранні терміни (перші години) пре- і постмортальних періодів.

Незважаючи на численні дослідження з даної проблеми із використанням при цьому найсучасніших методів, запропоновано дуже мало рекомендацій, які придатні для широкого впровадження в повсякденну практику. Зокрема, гістоензимохімічні, біохімічні, спектральні, біофізичні дані [1, 2], безсумнівно, збагачують арсенал діагностичних критеріїв, сприяють підвищенню обґрунтованості експертних висновків [3, 4]. Однак складність, високий матеріальний кошторис цих методик дослідження, недостатня репрезентативність деяких виявлених параметрів є перешкодою для їх впровадження. Єдиним,

найбільш доступним для застосування в судово-медичній практиці, залишається гістоморфологічний метод [5, 6].

Таким чином, питання про судово-медичну диференційну діагностику прижиттєвості ішемічних ушкоджень експрес-методами є до кінця не вивченим і зберігає актуальність, що, безсумнівно, вимагає подальшого глибокого вивчення і виявлення нових експертних критеріїв. У зв'язку із цим пошук діагностичних критеріїв, які необхідні для обґрунтування об'єктивних висновків відносно прижиттєвості і термінів виникнення ушкоджень, привів до необхідності здійснювати ретельне порівняльне дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи кафедри судової медицини та медичного правознавства ХНМУ "Обґрунтування судово-медичних діагностичних критеріїв, які використовують при експертизі живих осіб та при встановленні причин смерті" (№ держреєстрації: 0112U002384).

Мета дослідження полягає у підвищенні ефективності диференціації прижиттєвих й посмертних ішемічних ушкоджень м'яких тканин шляхом розробки експериментально обґрунтованого індикаторного методу залежно від температурного фактору із застосуванням нітротетразолію синього (п-НСТ).

Матеріали та методи дослідження

Експериментальна частина досліджень проведена на щурах лінії Wistar - савцях масою 250 - 300 г. Піддослідних тварин витримували на звичайному харчовому раціоні з вільним доступом до води по 8 тварин в стандартних клітках. Досліди здійснювали відповідно до національних "Загальних етичних принципів дослідів на тваринах" (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей" (Страсбург, 18.03.1986 р.). Виведення тварин з експерименту проводилися шляхом миттєвої дислокації після ін'єкції кетаміну 5 мг/кг в/в (у хвостову вену) для анестезії. У роботі використано мінімально допустиму для статистичної обробки й отримання достовірних результатів загальноприйнятну кількість тварин - 8 тварин у групі, а також мінімально достатню для досягнення мети й рішення

задач дослідження кількість експериментальних груп - 72 групи та 1 контрольна група (інтактні тварини).

Макроскопічна проба (якісна реакція) на ішемічне ураження проведена із застосуванням індикатора - 1 - 2% п-НСТ та за допомогою реакційної суміші, що містить 0,1% п-НСТ та β-НАД: смужку тканини поміщено в чашку Петрі, залито розчином реактиву та залишено з 1 до 40 хв. (з інтервалом 5 хв) в термостаті при температурі 37°C. Життєздатні тканини забарвлюються в синьо-фіолетовий колір, а зона ішемії не дає позитивної реакції і не містить барвника, або блідо-забарвлена. Основою даної реакції є відновлення п-НСТ за участю ферментів - дегідрогеназ з виділенням солей формазану. Таким чином, в результаті окисної реакції між субстратом та ферментом, а також відновлення солей п-НСТ, як кінцевий продукт реакції, утворюється формазан, який забарвлює життєздатні тканини у синьо-фіолетовий колір.

Кількісна оцінка ступеня ушкодження м'яких тканин проводилася спектрофотометрично; м'язи гомогенізували у розчині сахарози з фосфатним буфером - 1 мл гомогенату додавали до 1 мл 0,1% п-НСТ (та реакційної суміші), перемішували і поміщали на водяну баню при температурі 40°C протягом 20 хв. До кожного зразка додавали 400 мкл ацетону, потім перемішували і залишали при температурі 20°C протягом 15 хв. для вилучення пофарбованого формазаном гомогенату. Потім зразки центрифугували при 3000 об/хв. при температурі +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 із застосуванням програми "Biostat" за допомогою персонального комп'ютера [7].

Отримані результати та їх обговорення

В результаті дослідження було встановлено, що морфологічні макроскопічні зміни у зоні ішемії мало специфічні: ділянки ушкодження світліші за інтактний м'яз, мають м'яку консистенцію з набряком. При застосуванні індикаторних методів, які включали в якості барвника п-НСТ, встановлена різниця за часом фарбування (табл.1).

Інтенсивність забарвлення тканини залежно від часу термостатування (t=37°C)

Час, хв.	1% п-НСТ		0,1% п-НСТ+β-НАД	
	прижиттєві	постмортальні	прижиттєві	постмортальні
1	-	±	±	+
5	+	+	+	++
10	+	++	++	++
15	++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++
25	+++	+++	+++	+++
30	+++	+++	+++	+++
35	+++	+++	+++	+++
40	+++	+++	+++	+++

Примітка: - негативна реакція (забарвлення немає); ± - початкова реакція (слабке забарвлення); + - позитивна реакція; ++ - позитивна реакція, виражена лінія розмежування ішемічного локусу та інтактної ділянки (у випадку прижиттєвої ішемії - чітка демаркаційна лінія); +++ - інтенсивне забарвлення, лінія розмежування ураженої ділянки та інтактної не визначається.

Так, при порівнянні двох запропонованих індикаторних методів можна відмітити, що при застосуванні тільки 1% п-НСТ інтенсивність забарвлення дуже висока (рис.1), але можливо диференціювати прижиттєво ушкоджену ділянку тканини через 25 хв., а при застосуванні реакційної суміші відновлення п-НСТ відбувається вже на 15 хв. При застосуванні 1% п-НСТ демаркаційна лінія при прижиттєвому ішемічному ушкодженні виявляється тільки у 35% випадків (рис.2).



Рис 1. Інтенсивність забарвлення 1% п-НСТ на 25 хв (А) та 40 хв (Б): ішемічні ділянки не забарвлені, інтактні тканини мають фіолетовий колір.

При визначенні ступеня постмортального механічного ішемічного ушкодження встановлено, що реакція починається з першої хвилини термостатування при застосуванні двох методів,

але у випадку застосування реакційної суміші реакція проходить активніше - позитивна реакція відмічається вже на 5 хв.

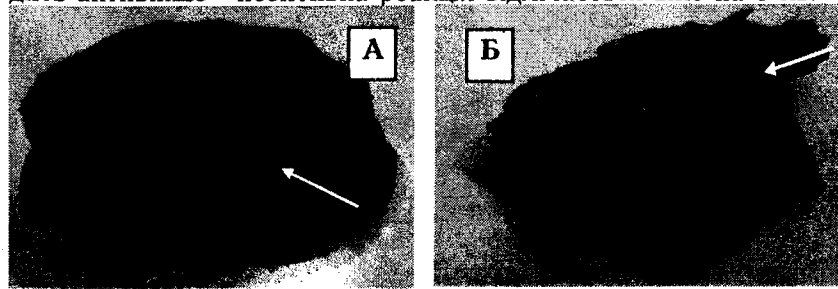


Рис. 2. Демаркаційна лінія при прижиттєвому ішемічному ушкодженні в експерименті (забарвлення 1% п-НСТ на 25 хв при $t=37^{\circ}\text{C}$).

Термостатування зразків тривалістю більше за 25 хв. не є доцільним, тому що це призводить до тотального забарвлення (см. рис.1-Б) у інтенсивно фіолетовий колір, лінія розмежування ділянок ураженого та інтактного м'язу не визначається, тобто важливим є факт чіткого дотримання часу реакції із застосуванням п-НСТ.

При застосуванні реакційної суміші, що містить основні реагенти: 0,1% п-НСТ та фермент - каталізатор β -НАД, було встановлено, що швидкість протікання реакції порівняно з індикацією тканин 1% НСТ у 2,5 рази вище. Демаркаційна лінія у групах тварин, де відтворювалась модель з прижиттєвим ішемічним ушкодженням, чітко виявляється (рис.3), також чітко виявляється лінія розмежування зони ішемічного ураження та інтактних тканин і в групі тварин з відтворенням моделі постмортального ішемічного ушкодження (рис.4).

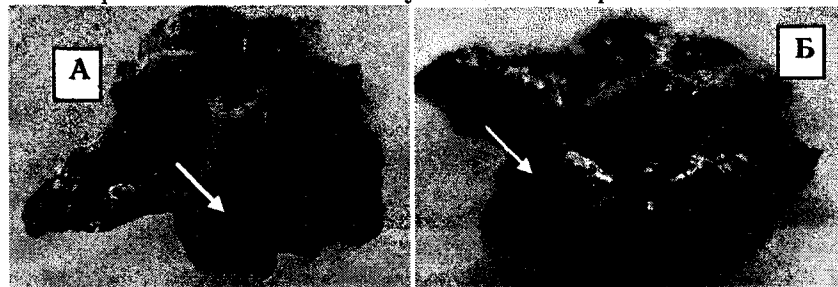


Рис. 3. Демаркаційна лінія при прижиттєвому ішемічному ушкодженні в експерименті: час протікання реакції 10 хв (А) та 15 хв (Б).

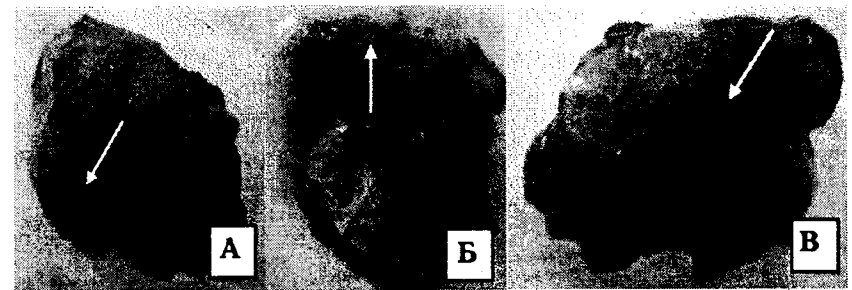


Рис. 4. Лінія розмежування ішемічної та інтактної ділянок тканини при постмортальному ішемічному ушкодженні в експерименті: час протікання реакції 15 хв (А), 10 хв (Б) та 15 хв (В).

При спектрофотометричному дослідженні гомогенізованих тканин було отримано наступні результати: при додаванні до гомогенату барвника п-НСТ встановлено зниження оптичної щільності, як при прижиттєвих, так й при постмортальних ішемічних ушкодженнях порівняно з інтактними тканинами при кімнатній температурі протягом 6 годин. Зафіксовано той факт, що після ішемічного прижиттєвого ушкодження через 1 годину спостерігається підвищення оптичної щільності за рахунок підвищення утворення формазану при відновленні п-НСТ життєздатними тканинами, тобто має місце компенсаторна реакція на ішемічне ураження (рис. 5).



Рис. 5. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t=18^{\circ}\text{C}$ з 0,1% п-НСТ).

Аналізуючи результати дослідження щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні після заморожування та проведення реакції з 0,1%

p-НСТ, встановлено зниження показників оптичної щільності при постмортальному ушкодженні через 1 годину у 2,13 рази та через дві години у 3,5 рази (рис. 6).



Рис. 6. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t = -10^{\circ}\text{C}$ з 0,1% p-НСТ).

Результати дослідження щодо визначення оптичної щільності гомогенату при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні після витримання тканин у термостаті при температурі 37°C протягом 1 години показали, що показники оптичної щільності були значно меншими, ніж такі, що були отримані у попередньому досліді і не перевищували 0,6 од.ощ. Це свідчить про ішемічне ураження м'язів, як при постмортальному, так й при прижиттєвому пошкодженні (рис.7) порівняно з інтактними тканинами.

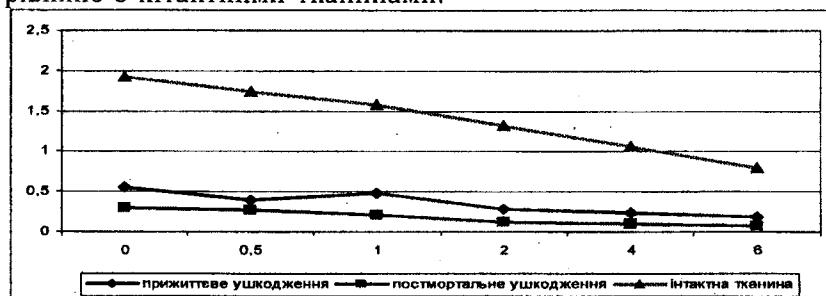


Рис. 7. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t = +37^{\circ}\text{C}$ з 0,1% p-НСТ).

При дослідженні оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні

залежно від температурного режиму при додаванні реакційної суміші встановлено відмінність між групами у часовому проміжку 1 година: при прижиттєвому ушкодженні спостерігається підвищення оптичної щільності гомогенату майже у 2,5 рази порівняно з постмортальним ішемічним ушкодженням (рис. 8).



Рис. 8. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t = 18^{\circ}\text{C}$ з 0,1% p-НСТ + β -НАД).

Така ж тенденція спостерігається при дослідженні гомогенату ушкоджених тканин під впливом підвищеної температури: 37°C , де оптична щільність гомогенату при прижиттєвому ішемічному ушкодженні у 2,4 рази вище, ніж при постмортальному (рис.9).



Рис. 9. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t = +40^{\circ}\text{C}$ з 0,1% p-НСТ + β -НАД).

Інша картина спостерігається при дослідженні оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні після заморожуванні дослідної ділянки: відмічається достовірне збільшення показників оп-

тичної щільності при прижиттєвому ішемічному ушкодженні порівняно з постмортальними показниками (рис.10), що потребує подальшого дослідження.



Рис. 10. Динаміка показників оптичної щільності гомогенату м'язів при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні ($t = -10^{\circ}\text{C}$ з 0,1% п-НСТ + β -НАД).

Таким чином, проведене дослідження показало, що застосування індикаторного методу з п-НСТ є важливим для судово-медичної експрес-діагностики при ішемічному прижиттєвому та постмортальному ушкодженні. Доцільним є застосування індикаторного методу комплексно з гістохімічними та імуноморфологічними методами, що потребує ретельного вивчення.

Висновки

1. Практична цінність дослідження полягає у визначенні можливості макроскопічної судово-медичної діагностики прижиттєвості ішемічних ушкоджень, що виникли у премортальний період, та візуалізації виявлення змін тканин ішемічного походження.

2. При використанні визначених результатів з експериментальним обґрунтуванням індикаторного експрес-методу із застосуванням п-НСТ та реакційної суміші у судово-медичній експертизі трупів отримана можливість якісної та кількісної диференційної діагностики, що спрямована на вирішення судово-медичних питань, юридичних проблем та сприятиме загально-медичним лікувально-діагностичним напрямкам.

3. Доступність запропонованої методики дозволить проводити дослідження на рівні районних, міжрайонних та міських відділень бюро судово-медичної експертизи та надасть можливість отримувати

вати інформацію для встановлення прижиттєвості та давності виникнення ішемічних ушкоджень м'яких тканин.

Література

1. Пат. № 14411 U, UA, МПК А61В 5/05, G01N 33/483 Спосіб визначення давності настання смерті шляхом дослідження біофізичних властивостей тканини трупа / Мішалов В.Д., Бурчинський В.Г., Хохолева Т.В., Войченко В.В., Сулоєв К.М., Федченко М.М., Бабкіна О.П. - З. № u200510902; Заявл. 17.11.2005; Опубл. 15.05.2006.

2. Вавилов А.Ю. Современные биофизические методы количественной регистрации в судебно-медицинской науке и практике / А.Ю. Вавилов, А.А. Халиков // Медицинский вестник Башкортостана. - 2007. - Т. 2, № 1. - С. 50-56.

3. Конорева А.К. Определение прижизненности и давности поврежденной на трупах, извлеченных из водоёмов / А.К. Конорева, С.В. Хасаньянова // Проблемы экспертизы в медицине. - 2010. - Т. 10, № 3-4. - С. 55-56.

4. Пат. № 31624 U, UA, МПК G01N 33/00 Спосіб визначення давності настання смерті за допомогою кореляційного аналізу часових змін структури лазерних зображень біологічних тканин трупа людини / Буковинський державний медичний університет МОЗ України, Бачинський В.Т. - З. № u200800183; Заявл. 04.01.2008; Опубл. 10.04.2008.

5. Халиков А.А. Состояние и перспективы проблемы определения прижизненности и давности механических повреждений / А.А. Халиков, А.Ю. Вавилов, С.В. Хасаньянова // Проблемы экспертизы в медицине. - 2005. - Т. 05, № 17-1. - С. 36-40.

6. Халиков А.А. Диагностический алгоритм биофизического исследования тканей тела человека при решении вопроса давности их механического повреждения / А.А. Халиков // Медицинский вестник Башкортостана. - 2011. - Т. 6, № 2. - С. 372-375.

7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. - Киев: МОРИОН, 2000. - 320 с.

Резюме

Кісь А.В. Застосування індикаторного методу в якості судово-медичної експрес-діагностики ішемічних прижиттєвих і постмортальних уражень м'язів.

Проведено експериментальне відтворення механічного ішемічного ураження м'яких тканин та щурах лінії Wistar. Доведено можливість застосування індикаторного методу з п-НСТ та β-НАД для виявлення зони ішемії м'язів, що не визначається візуально. Виявлено час початку реакції та час тотального фарбування зразку тканини та встановлено інформативні спектрофотометричні параметри. Показана доцільність застосування індикаторного методу з п-НСТ та β-НАД в якості судово-медичної експрес-діагностики ішемічних прижиттєвих і постмортальних уражень м'язів.

Ключові слова: індикаторний метод, ішемічні ушкодження м'яких тканин, п-НСТ, β-НАД, судово-медична діагностика.

Резюме

Кись А.В. *Применение индикаторного метода в качестве судебно-медицинской экспресс-диагностики ишемических прижизненных и постмортальных поражений мышц.*

Проведено експериментальне воспроизведення механічного ішемічного ураження м'яких тканин на щурах лінії Wistar. Доказана можливість застосування індикаторного методу з використанням п-НСТ та β-НАД для виявлення зони ішемії м'язів, котра не визначається візуально. Виявлено час початку реакції та час тотального окрашування зразка тканини та встановлено інформативні спектрофотометричні параметри. Показана цілесобразність застосування індикаторного методу з використанням п-НСТ та β-НАД в якості судово-медичної експрес-діагностики ішемічних прижиттєвих і постмортальних уражень м'язів.

Ключевые слова: индикаторный метод, ишемические повреждения мягких тканей, п-НСТ, β-НАД, судебно-медицинская диагностика.

Summary

Kis A. *Application of tracer methods as forensic medical express lifetime and diagnosis of ischemic muscle damage postmortalnyh.*

The experimental reproduction of mechanical ischemic lesion of the soft tissues in the rat line Wistar. Proved the possibility of using the tracer method using n-NST and β-NAD to identify areas of muscle ischemia, which is not determined visually. Revealed the start of the reaction time and the total sample of tissue staining and spectrophotometric informative set parameters. The expediency of application of the tracer method using n-NST and β-NAD as a forensic rapid diagnosis of ischemic lesions in vivo and postmortalnyh muscles.

Key words: the indicator method, ischemic damage to the soft tissue, n-CNT, β-NAD, the forensic medical diagnosis.

Рецензент: д.мед.н., проф. С.А.Кашенко

УДК 616.24-002-085.23-06:616

ВПЛИВ НЕГОСПІТАЛЬНОЇ ПНЕВМОНІЇ НА ЯКІСТЬ ЖИТТЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ СУПУТНІМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

О.С. Махаринська

Харківська медична академія післядипломної освіти

Вступ

Цукровий діабет (ЦД), захворюваність на який в теперішній час має вигляд епідемії у всьому світі, усе більшою мірою викликає занепокоєння у медичному середовищі. Це захворювання асоціюється із підвищенням смертності із зростанням віку пацієнта у 2 рази [1, 2], а також вищою кількістю супутньої хронічної патології [3-5]. Так наприклад, науковці США, відмітили переважання серцево-судинної патології, інсультів та депресії у пацієнтів із ЦД [6-9]. Міжнародні дослідження виявили шкідливий вплив ЦД на наслідки супутніх захворювань та якість життя (ЯЖ) пацієнтів [6-7]. В Medical Outcomes Study було доведено погіршення усіх показників якості життя, окрім психічного здоров'я та болю [4]. У багатьох інших дослідженнях за допомогою опитувальника SF-36 (Medical Outcomes Short-Form 36) довели негативний вплив ЦД на рівень загального здоров'я пацієнтів, подібно до серцево-судинних, хронічних респіраторних хвороб та онкологічних захворювань, причому кожне супутнє захворювання синергічно значно погіршувало ЯЖ пацієнтів [4, 8]. Хворі із ЦД та множинними супутніми хворобами характеризуються нижчою ЯЖ ніж пацієнти без супутньої патології. Так наприклад у пацієнтів із ЦД та супутніми ішемічною хворобою серця (ІХС), периферичною судинною хворобою та периферичною сенсорною нейропатією показники ЯЖ, що були виміряні за допомогою запитальника SF-36, були значимо нижчими. Такий вплив можна пояснити тим, що лікування однієї медичної патології може мати несприятливий вплив на течію іншого існуючого супутнього захворювання та призводить до більшого погіршення ЯЖ пацієнта ніж те, що спричиняло одиничне супутнє захворювання [11]. Раніше було опубліковано 2 дослідження, що вивчали зв'язок між ЦД та іншими супутніми