

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА АНАЛИЗА В СУДЕБНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДАВНОСТИ И ПРИЖИЗНЕННОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ОГНЕСТРЕЛЬНОЙ ТРАВМЕ

Збруева Ю.В.¹, Семенов Г.Г.², Путинцев В.А.³, Богомолов Д.В.³, Джуваляков П.Г.⁴

¹ФГБУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань, Россия, e-mail: z_b_r@mail.ru;

²БУ Чувашской республики «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России Чувашской республики, Чебоксары;

³ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, Москва;

⁴ФГБНУ НИИ Морфологии человека, Москва

Цель исследования заключается в использовании иммуногистохимического и морфометрического методов в диагностике огнестрельной травмы. Проведено судебно-медицинское исследование 85 умерших от огнестрельных ран (первая группа). Забор морфологического материала проведен на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 10-е сутки смерти. Материал был изъят из раневого канала. В качестве сравнения использован материал, полученный от колото-резаного ранения (вторая группа) в аналогичном сроке наступления смерти. Методы исследования: морфометрический, иммуногистохимический, иммунопероксидазный. По данным иммуногистохимического исследования установлено, что при разной давности (в течение 30 минут, 3–5–7–10 суток) повреждения мягкой ткани значения исследуемых параметров (лимфоцитов, нейтрофилов, макрофагов и др.) отличаются в зависимости от вида повреждения (огнестрельного, колото-резаного). Основной морфологический признак огнестрельного ранения – наличие кровоизлияний, фрагментации мышечных и коллагеновых волокон, жировых кист. В гистологической диагностике огнестрельной травмы применяются ряд методов, таких как иммуногистохимические и полуколичественные, позволяющих определить в тканях организма вещества, которые не могут быть диагностированы рутинными методами исследования. Полученные отличия могут быть связаны как со специфическими факторами выстрела, в частности с термическим действием, так и с более выраженными изменениями микроциркуляции и клеточной миграции при огнестрельных повреждениях.

Ключевые слова: огнестрельное повреждение, судебно-медицинская экспертиза, танатогенез, время наступления смерти, иммуногистохимические исследования, морфометрия.

APPLICATION OF THE COMPLEX METHOD OF ANALYSIS IN THE FORENSIC HISTOLOGICAL DIAGNOSIS OF PRESCRIPTION AND LIFETIME OF SOFT TISSUE INJURIES IN GUNSHOT TRAUMA

Zbrueva Yu.V.¹, Semenov G.G.², Putintsev V.A.³, Bogomolov D.V.³, Dzhuvalyakov P.G.⁴

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: z_b_r@mail.ru;

²Republican Bureau of Forensic Medical Examination of the Chuvash Republic, Cheboksary;

³Russian Center of Forensic Medical Examination, Moscow;

⁴The Institute of Human Morphology, Moscow

To use the use of immunohistochemical and morphometric methods in the diagnosis of gunshot injury. A forensic medical study was conducted of 85 victims (the first group) with gunshot injuries, died from their injuries. Morphological material was collected on the 1st, 3rd, 5th, 7th, and 10th days of death. It was removed from the wound canal. As a comparison group, the material obtained from a stab wound (the second group) at the same time of death was used. Methods of research – Morphometric, immunohistochemical, immunoperoxidase. According to the data of the immunohistochemical study, it was found that with different duration (within 30 minutes, 3–5–7–10 days) of soft tissue damage, the values of the studied parameters (lymphocytes, neutrophils, macrophages, etc.) differ depending on the type of damage (gunshot, stab). The main morphological signs of a gunshot wound are the presence of hemorrhages, fragmentation of muscle and collagen fibers, fat cysts. In the histological diagnosis of a gunshot injury, a number of methods are used, such as immunohistochemical and semi-quantitative ones, which allow determining substances in the tissues of the body that cannot be diagnosed by routine research methods. The differences obtained can be associated with both specific factors of the shot, in particular, the thermal effect, and with more pronounced changes in microcirculation and cell migration in gunshot injuries.

Keywords: gunshot injury, forensic medical examination, thanatogenesis, the time of death, immunohistochemical research, morphometry.

В последние десятилетия в мирном сосуществовании при различных ситуациях социальной напряженности и проявлении криминогенной обстановки в России отмечается прогрессивный рост частоты огнестрельных ранений (ОСР) [1].

По данным Национальной ассоциации медицинских экспертов и стандартов расследования случаев смерти (Нью-Йорк, 2013 г.), огнестрельное повреждение в судебно-медицинской экспертизе считается одним из сложнейших ее видов. Оно представляет собой серьезный вопрос в медицинской практике [2].

Основным фактором, вызывающим тканевые повреждения организма, представляется огнестрельное оружие и его элементы – дополнительные вещества снаряда (пороховые, металлические, копотные, масляные частицы). Они могут оказать разнообразное деструктивное воздействие на ткани организма [3].

Особенность патогенетического процесса данного типа травматизации состоит в том, что разрушение тканевой целостности организма в области ранения является последствием воздействия повреждающего агента физического характера, сопровождающегося изменением метаболизма клеток, их гибелью, тканевым распадом, расстройством локальной иммунной системы и микроциркуляции, высвобождением биологических медиаторов [4].

В патогенетическом процессе ОСР участвуют 4 фактора: ударно-волновой эффект ранящего снаряда, воздействие повреждающего агента, боковой удар самой пули, влияние вихревой струи, появляющейся позади повреждающего элемента.

По классификации Г.И. Назаренко и соавт. (2002) выявлено, что заживление раневого нарушения анатомической целостности проходит ряд стадий: фаза воспаления (стадия альтерации, экссудации, отторжения погибших элементов, обработки и очистки раны), фаза репарации (образование грануляций и их рубцевание с развитием соединительной ткани и закрытием раны) и фаза ремоделирования (период эпителизации рубца и его реорганизации с регенерацией утраченных тканевых структур) [5, 6].

В судебной медицине вопрос об определении давности и прижизненности возникновения повреждений в мягких тканях является одним из наиболее важных. В диагностике ОСР большую роль играет гистологический метод, которым можно оценивать реактивные изменения, возникающие на посттравматическом сроке.

Также в подробном исследовании огнестрельного ранения применяются и другие способы, такие как патоморфологический, иммуногистохимический, теплофизический [7, 8].

Цель работы заключается в использовании иммуногистохимического и морфометрического методов в диагностике огнестрельной травмы.

Материал и методы исследования

Проведено судебно-медицинское исследование 85 лиц, умерших от огнестрельных повреждений (первая группа, основная).

Известно, что определение давности раневого повреждения можно осуществлять при помощи морфометрического и иммуногистохимического методов [9].

Забор морфологического материала ОСР проведен на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 10-е сутки смерти. Он был изъят из раневого канала.

В качестве сравнения использован материал, полученный от колото-резаного ранения (вторая группа, группа сравнения, n=30), на аналогичном сроке наступления смерти.

Полученные фрагменты тканей подвергали стандартной парафиновой оценке с помощью гистологических и гистохимических окрасок, стандартному иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию по непрямому иммунопероксидазному методу.

Морфометрический анализ проводили с использованием объекта-микрометра при увеличении 10x20 диаметр поля зрения 880 мкм, при 10x40 диаметр поля зрения 460 мкм.

По данным литературы, в некротической зоне раневого канала отмечается утрачивание тонких структур. Ткань подвергается аутолизу с наличием кровоизлияний с быстрым гемолизом эритроцитов. В зависимости от срока смерти обнаруживается различная степень сосудистой реакции, которая проявляется в виде спазма сосудов разного диаметра с развитием дистонии [10, 11].

Для установления прижизненности ОСР использовали ИГХ-маркер – фибриноген, а для оценки выраженности его характера применяли ИГХ-реакцию в виде деформации виментина. Фибриноген – бесцветный белок, растворенный в плазме крови, предшественник фибрина, проникающий в ткани сразу после повреждения сосудов и являющийся маркером прижизненности. Виментин — цитоплазматический белок промежуточных филаментов клеток соединительных тканей и других тканей мезодермального происхождения. В результате его пластичности клетка сохраняет целостность [12, 13].

В процессе секционного и последующего гистологического исследования с применением иммуногистохимического метода выполнен отбор мягких тканей из стенки огнестрельного канала. Материал фиксирован в нейтральном формалине. Далее проведена стандартная таксация материала с применением иммуноштейнера и антител к фибриногену для мягких тканей в стенке раневого канала, к саркомерному актину, актину гладкомышечных клеток и виментину для клеточных элементов, к CD-антигенам для элементов клеточной реакции.

Полученные результаты обработаны программой «MS Excel 2013». Разница средних по значениям ошибки среднего (m), полученная в результате морфометрического анализа сравнения показателей раневых каналов огнестрельных и колото-резаных ранений, а также при расчете величины средних значений и отклонений, является достоверной.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате сравнительного морфометрического исследования огнестрельных и колото-резаных повреждений получены следующие результаты, которые отражены в таблице.

Сравнение результатов морфометрии огнестрельных и колото-резаных повреждений

Объекты исследования	Колото-резаные повреждения, 400х (сумма среднего, стандартное отклонение, ошибка среднего)	Огнестрельные повреждения, 400х (сумма среднего, стандартное отклонение, ошибка среднего)
<i>Лимфоциты, до 30 минут после получения травмы</i>		
Некроз	21±2,4 m=0,8	10±2,0 m=0,6
ЗРИ/ЗМС	14±2,2 m=0,7	22±5,1 m=1,6
<i>Нейтрофилы, до 30 минут после получения травмы</i>		
Некроз	8±7,6 m=1,0	4±1,5 m=0,5
ЗРИ/ЗМС	3±3,3 m=0,3	5±1,5 m=0,5
<i>Макрофаги, до 30 минут после получения травмы</i>		
Некроз	3±3,4 m=0,4	1±0,4 m=0,1
ЗРИ/ЗМС	2±1,5 m=0,2	2±0,7 m=0,2
<i>Площадь поражения, до 30 минут после получения травмы</i>		
Некроз	1±0,1 m=0	1±0,1 m=0
ЗРИ/ЗМС	1±0,1 m=0	1±0,1 m=0
<i>Лимфоциты, через 3 суток после получения травмы</i>		
Некроз	25±7,5 m=2,4	13±3,3 m=1,0
ЗРИ/ЗМС	23±3,3 m=1,0	11±2,4 m=0,8
<i>Нейтрофилы, через 3 суток после получения травмы</i>		
Некроз	10±2,8 m=0,9	18±4,7 m=1,5
ЗРИ/ЗМС	8±2,1 m=0,7	12±3,0 m=1,0
<i>Макрофаги, через 3 суток после получения травмы</i>		
Некроз	10±3,1 m=1,0	7±1,9 m=0,6

ЗРИ/ЗМС	9±2,8 m=0,9	6±1,8 m=0,6
<i>Площадь поражения, через 3 суток после получения травмы</i>		
Некроз	1±0,1 m=0	1±0,1 m=0,1
ЗРИ/ЗМС	1±0,1 m=0	1±0,2 m=0,1
<i>Лимфоциты, через 5 суток после получения травмы</i>		
Некроз	25±6,5 m=2,1	11±3,2 m=1
ЗРИ/ЗМС	20±2,4 m=0,8	9±2,7 m=0,8
<i>Нейтрофилы, через 5 суток после получения травмы</i>		
Некроз	9±2,3 m=0,7	16±3,7 m=1,2
ЗРИ/ЗМС	8±1,7 m=0,5	10±3,4 m=1,1
<i>Макрофаги, через 5 суток после получения травмы</i>		
Некроз	10±2,4 m=0,8	8±1,9 m=0,6
ЗРИ/ЗМС	8±1,9 m=0,6	7±1,5 m=0,5
<i>Площадь поражения, через 5 суток после получения травмы</i>		
Некроз	1±0,1 m=0	1±0,2 m=0,1
ЗРИ/ЗМС	1±0,1 m=0	1±0,2 m=0,1
<i>Лимфоциты, через 7 суток после получения травмы</i>		
Некроз	12±3,1 m=1,0	13±3,1 m=1,0
ЗРИ/ЗМС	9±2,1 m=0,7	10±2,1 m=0,7
<i>Нейтрофилы, через 7 суток после получения травмы</i>		
Некроз	6±1,9 m=0,6	6±2,0 m=0,6
ЗРИ/ЗМС	3±1,6 m=0,4	3±1,5 m=0,3
<i>Макрофаги, через 7 суток после получения травмы</i>		
Некроз	13±2,7 m=0,8	15±2,7 m=0,8
ЗРИ/ЗМС	11±1,8 m=0,6	11±1,8 m=0,6
<i>Площадь поражения, через 7 суток после получения травмы</i>		
Некроз	1±0,1 m=0	1±0,1 m=0
ЗРИ/ЗМС	1±0,2 m=0,1	1±0,2 m=0,1
<i>Лимфоциты, через 10 суток после получения травмы</i>		
Некроз	7±1,5 m=0,5	10±2,7 m=0,9
ЗРИ/ЗМС	7±2,2 m=0,7	12±2,0 m=0,6
<i>Нейтрофилы, через 10 суток после получения травмы</i>		
Некроз	5±2,0 m=0,6	6±1,8 m=0,9
ЗРИ/ЗМС	2±1,1 m=0,3	4±1,5 m=0,5

<i>Макрофаги, через 10 суток после получения травмы</i>			
Некроз	14±2,5	m=0,8	15±2,5 m=0,8
ЗРИ/ЗМС	12±2,3	m=0,7	15±3,2 m=1,0
<i>Площадь поражения, через 10 суток после получения травмы</i>			
Некроз	1±0,2	m=0	1±0,2 m=0
ЗРИ/ЗМС	1±0,2	m=0	1±0,1 m=0

Примечание. ЗРИ – зона реактивных изменений. ЗМС – зона молекулярного сотрясения

В таблице представлен материал исследования, который был распределен на 5 этапах: не более 30 минут, около 3-х, 5-х, 7-х и 10-х суток.

При давности ОСР не более 30 минут в первой группе количество лимфоцитов в зоне некроза преобладает над таким же показателем в аналогичной зоне огнестрельного повреждения. В зоне реактивных изменений при колото-резаном повреждении значительно понижено количество лимфоцитов в отличие от второй группы. В то же время количество нейтрофилов в зоне некроза группы сравнения значительно превышало показатели основной группы. При сравнении показателей макрофагов в соответствующих участках нами получены данные, которые показывают, что при колото-резаном повреждении количество макрофагов больше, чем при огнестрельном (таблица).

При давности ранения примерно 3 суток показано, что в зоне некроза лимфоциты преобладают в первой группе повреждения, в отличие от второй группы. Параллельно уровень нейтрофилов в зоне некроза был больше в основной группе относительно группы с колото-резаной травмой. Количество макрофагов имеет практически сходные значения в обеих группах.

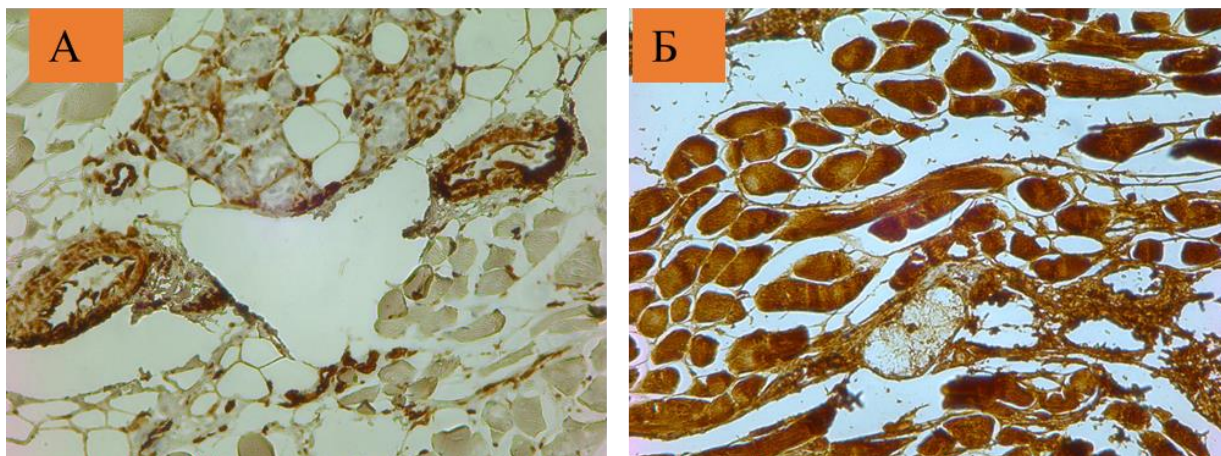
При давности переживания травмы около 5 суток установлено, что в раневой области концентрация лимфоцитов была превышена в первой группе. Одновременно в некротической зоне количество нейтрофилов при огнестрельном ранении было больше, чем в группе сравнения. Таким образом, количество макрофагов в первой группе превышало такое во второй группе.

При давности травматизации 7 суток выявлено, что уровни лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов в исследуемых зонах как в первой группе, так и во второй по ходу наблюдения были соответственно равны.

При давности травмы 10 суток зарегистрировано, что количество лимфоцитов в раневой зоне в группе сравнения было меньше, чем в основной. В зоне молекулярного сотрясения концентрация лимфоцитов преобладала над реактивными изменениями в первой группе. Показатели нейтрофилов как в зоне некроза, так и в зоне молекулярного сотрясения

группы сравнения незначительно превышали аналогичные показатели в группе сравнения. Количество макрофагов в зоне некроза и в зоне молекулярного сотрясения различается незначительно.

Мягкие ткани из области стенок раневых каналов были изучены с применением ИГХ-реакции и оценивались по следующим морфологическим признакам: наличие кровоизлияний, фрагментации мышечных и коллагеновых волокон, жировых кист при рутинных окрасках как в зоне некроза, так и в зоне молекулярного сотрясения; наличие мелких кровоизлияния в зоне молекулярного сотрясения при окраске по Шпильмайеру; наличие лизиса саркомерного актина в мышечных волокнах при постановке соответствующей реакции; значительная интенсивность ИГХ-реакции с антителами к фибриногену в толще мышечных волокон и в строме; выраженность ИГХ-реакции с антителами к виментину и гладкомышечному актину в сосудах зоны молекулярного сотрясения; наличие дезорганизации citoархитектоники цитоскелета в сосудистых миоцитах. В других стромальных элементах отмечались потеря циркулярной ориентации в сосудах, денатурация по типу глыбчатого распада; оценка танатогенеза при танатогенетическом анализе; морфометрическая оценка лейкоцитарной реакции в зонах некроза и молекулярного сотрясения с уточнением типа лейкоцитов с учетом CD-антигенов.



ИГХ-метод. Деформация виментина в стенках сосудов – а, имбибиция фибриногеном мышечных волокон – б

Прижизненные огнестрельные ранения характеризуются экссудацией фибриногена; наличием деформации цитоскелета (виментина); наличием отека, жировых кист и кровоизлияний в стенке раневого канала; наличием дезорганизации citoархитектоники внутриклеточных сократительных и других промежуточных филаментов мышечных и других стромальных клеток в зоне молекулярного сотрясения; имбибицией плазменными белками

мышечных волокон в зоне молекулярного сотрясения при ее отсутствии в зоне некроза, в том числе термического (рисунок). Интенсивность ИГХ-реакции с антителами к фибриногену в области молекулярного сотрясения значительно выше, чем в интактной ткани области дермы и подкожной клетчатке интактных мягких тканей кожи.

При давности травмы не более 30 минут при огнестрельных повреждениях отмечается замедление воспалительной реакции по отношению к колото-резаным ранам в зоне реактивных изменений. На более поздних сроках переживания происходит выравнивание воспалительной реакции.

Эти отличия могут быть связаны как со специфическими факторами выстрела, в частности термическим действием, так и с более выраженными изменениями микроциркуляции и клеточной миграции при огнестрельных повреждениях в сравнении с колото-резаными ранами.

Изучая вопрос определения танатогенеза при смерти от различных огнестрельных повреждений, целесообразно применять методы танатогенетического (полуколичественного) анализа, который позволит на основании доступного морфологического исследования составить суждения о виде смерти, темпе умирания и других вопросах танатогенеза, а также исходя из этих данных можно уточнить выводы о давности огнестрельных повреждений.

Выводы

1. Основным морфологическим признакам огнестрельного ранения служит наличие кровоизлияний, фрагментации мышечных и коллагеновых волокон, жировых кист.

2. В гистологической диагностике огнестрельной травмы применяется ряд методов, таких как иммуногистохимические и полуколичественные, позволяющие определить в тканях организма вещества, которые не могут быть диагностированы рутинными методами исследования.

Список литературы

1. Ian Barner-Rasmussen, Oskari Frisk, Lauri Handolin, Erkki. Tukiainen Gunshot wounds in Finland. *Duodecim*. 2016. V. 132 (22). P. 2080-2086.
2. Jennifer C. Bready, Robert J. Bready, Dennis J. Chute. A Ten-year Study of Suicides from a Rural/Suburban County. *J. Forensic Sci.* 2017. V. 62 (4). P. 911-914. DOI: 10.1111/1556-4029.13352.
3. Katherine A. Fowler, Linda L. Dahlberg, Tadesse Haileyesus, Carmen Gutierrez, Sarah Bacon. Childhood Firearm Injuries in the United States. *Pediatrics*. 2017. V. 140 (1). P. e20163486. DOI: 10.1542/peds.2016-3486.

4. Gusentsov A.O., Kildushov E.M. Effect of the target type on the characteristics of gunshot injuries resulting from bullet and shrapnel ricochet. *Sud Med Ekspert.* 2022. V. 65 (5). P. 34-38.
5. Zbrueva Yu.V., Bogomolov D.V., Putintsev V.A. A Case of Death as the Result of Firing from Self-Made Firearms. *Systematic Reviews in Pharmacy.* 2020. V. 11 (4). P. 06-08.
6. Алексеева Е.В. Танатология и танатогенез: исторические факты, проблемы и перспективы изучения // *Медицинские новости.* 2018. № 2 (281). С. 10-17.
7. Бавыкин Д.В., Бахметьев В.И. Маркеры клеточной пролиферации Ki67 и антиапоптоза Bcl-2 при огнестрельных повреждениях // *Прикладные информационные аспекты медицины.* 2016. № 19 (3). С. 144-150.
8. Matsushita M., Nonaka., Iwasaki T., Kuwamoto S., Murakami I., Kato M., Nagata K., Kitamura Y., Hayashi K. A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect small T-antigen expressions of Merkel cell polyomavirus (MCPyV). *Diagn Pathol.* 2014. № 9. P. 65.
9. Богомолов Д.В., Федулова М.В., Шай А.Н., Павлова А.З., Збруева Ю.В. Роль иммуногистохимического исследования в установлении прижизненности и выраженности огнестрельных повреждений мягких тканей // *Судебно-медицинская экспертиза.* 2018. № 61 (6). С. 46-47. DOI: 10.17116/sudmed20186106146.
10. Ковалев А.В., Макаров И.Ю., Самоходская О.В., Куприна Т.А. Структура смертельной механической травмы в России (по материалам 2003—2017 гг.) // *Судебно-медицинская экспертиза.* 2019. № 62 (2). С. 11-15. DOI: 10.17116/sudmed20196202111.
11. Hlavaty L., Roquero L., Amley J., Root K., Ishikawa M., Koopmeiners A., Zhao L., Sung L. Discordance of Gross and Histologic Findings in Estimating the Range of Fire of Gunshot Wounds. *J. Forensic Sci.* 2019. V. 64 (5). P. 1399-1411.
12. Макаров И.Ю., Гюльмамедова Н.Д., Богомолов Д.В., Шай А.Н. О возможностях выявления признаков термического воздействия факторов выстрела при формировании огнестрельных ран // *Судебно-медицинская экспертиза.* 2018. № 61 (6). С. 57-61. DOI: 10.17116/sudmed20186106157.
13. Трухан А.П., Летковская Т.А., Жидков С.А., Корик В.Е., Жидков А.С., Терешко Д.Г., Пивоварчик С.Н. Морфологические особенности раневого канала огнестрельном ранении // *Военная медицина.* 2015. № 3 (36). С. 90-91.