

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ АСФИКТИЧЕСКОГО ТИПА УТОПЛЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Гиниатуллин Р.У.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Южноуральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Челябинск, e-mail: gru54@mail.ru*

Количественная морфология реакций апудоцитов в слизистой оболочке гортани при утоплении в зависимости от возраста животных не изучена; не представляется возможным наиболее точно проводить дифференциальную диагностику асфиктических типов утопления. Цель исследования: разработать микроскопический признак для диагностики асфиктического типа утопления. Проведен эксперимент на 30 белых нелинейных крысах-самцах в возрасте 2-6 мес., разделенных на 2 группы: экспериментальную (n = 20) и контрольную (n = 10 животных). У животных обеих групп определяли уровень серотонина в крови с помощью иммуноферментного метода. Крысы экспериментальной группы подвергались свободному утоплению в ванне. Животные контрольной группы утоплению не подвергались. В препаратах слизистой оболочки гортани, окрашенных по методу Гримелиуса, определяли количество аргирофильных апудоцитов, а с помощью иммуногистохимического метода – число серотонинпродуцирующих АПУД-клеток. Применялись методы вариационной статистики. У 2-месячных животных группы эксперимента отмечено достоверно больше серотонинсодержащих апудоцитов в слизистой оболочке гортани по отношению к показателям крыс в возрасте 6 месяцев группы контроля. Это способствует ларингоспазму, что препятствует проникновению воды в легкие. Наличие выраженной гиперплазии серотонинсодержащих апудоцитов в слизистой оболочке гортани у более молодых животных может быть использовано в качестве диагностического признака асфиктического типа утопления в экспериментальных исследованиях.

Ключевые слова: крысы, асфиктический тип утопления, слизистая оболочка гортани, апудоциты, морфометрия.

MORPHOLOGICAL ASPECTS OF DIAGNOSIS OF ASPHYXIATION TYPE OF DROWNING (EXPERIMENTAL RESEARCH)

Giniatullin R.U.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "South Ural State Medical University"
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, e-mail: gru54@mail.ru*

Quantitative morphology of apudocyte reactions in the laryngeal mucosa during drowning depending on the age of the animals has not been studied; it is not possible to carry out the most accurate differential diagnostics of asphyxic types of drowning. Objective of the study: to develop a microscopic sign for the diagnosis of the asphyxic type of drowning. An experiment was conducted on 30 white nonlinear male rats aged 2-6 months, divided into 2 groups: experimental (n = 20) and control (n = 10 animals). In animals of both groups, the level of serotonin in the blood was determined using the enzyme immunoassay. Rats of the experimental group were subjected to free drowning in a bath. Animals of the control group were not subjected to drowning. In the laryngeal mucosa preparations stained by the Grimelius method, the number of argyrophilic apudocytes was determined, and the number of serotonin-producing APUD cells was determined using the immunohistochemical method. The methods of variation statistics were used. In 2-month-old animals of the experimental group, there were significantly more serotonin-containing apudocytes in the laryngeal mucosa in relation to the indicators of 6-month-old rats of the control group. This contributes to laryngospasm, which prevents water from penetrating into the lungs. The presence of pronounced hyperplasia of serotonin-containing apudocytes in the laryngeal mucosa in younger animals can be used as a diagnostic sign of asphyxial drowning in experimental studies.

Keywords: rats, asphyxial drowning, laryngeal mucosa, apudocytes, morphometry.

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно в мире погибают из-за утопления 236 000 человек [1]. В зависимости от главенствующей в наступлении смерти роли патологии предложено подразделять утопление по патогенетическому типу на аспирационный, асфиктический [2]. Известно, что одной из важных систем, обеспечивающих местный гомеостаз органов дыхания в норме и патологии, является их эндокринный аппарат. При этом апудоциты ее вырабатывают гормоны и биогенные амины, в частности серотонин, обеспечивающий паракринную регуляцию в слизистой оболочке гортани (СОГ), в том числе спазм гладкомышечных волокон, содержащих рецепторы к этому биогенному амину [3; 4]. Наряду с этим количественная морфология реакций апудоцитов в СОГ при утоплении в зависимости от возраста животных не изучена; не представляется возможным наиболее точно проводить дифференциальную диагностику «сухих» (асфиктических) типов утопления [5, с. 259].

Цель исследования – разработка дополнительного микроскопического диагностического признака для верификации асфиктического типа утопления.

Материалы и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с принципами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), а также Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года, касающейся защиты животных, применяемых в научных исследованиях. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южноуральский государственный медицинский университет» Минздрава России (Протокол № 23 от 22.09.2010 г.).

Эксперимент был выполнен на 30 белых нелинейных крысах-самцах (из питомника и вивария Южно-Уральской государственной медицинской академии), которых, по методу аналогов, разделили на две группы: экспериментальную (ЭГ, n=20, возраст 2 мес., масса тела $220,15 \pm 2,85$ г) и контрольную (КГ, n = 10 крыс, возраст 6 мес., масса тела $490,0,9 \pm 3,17$ г). Содержание животных осуществлялось в условиях вивария с соблюдением основных зоогигиенических норм (температура 20-24 °С), при 12-часовом световом дне и свободном доступе к воде и корму.

У особей обеих групп производился забор крови в чистые сухие пробирки для получения сыворотки, в которой определялось содержание серотонина (пг/мл) методом иммуноферментного анализа [6]. Измерения проводились на программируемом фотометре для

микропланшетов STAR FAX 303 PLUS (США) в соответствии с инструкциями производителя тест-систем (IBL, Германия).

Все животные ЭГ подвергались свободному плаванию в ванне (температура воды 26-28 °С) до утопления. Продолжительность плавания составила в среднем $5,82 \pm 0,72$ минуты. После прекращения признаков жизни трупы животных извлекались из воды через 10 минут, осуществлялся забор периферической крови для определения уровня серотонина, проводилось вскрытие. Крысы КГ утоплению не подвергались.

Образцы гортани животных экспериментальной и контрольной групп фиксировались в жидкости Буэна, парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином, импрегнировались нитратом серебра по методу Гримелиуса; проводилась идентификация апудоцитов, содержащих серотонин, с использованием иммуногистохимического метода окрашивания срезов: краситель DAB, первичные специфические для крыс антитела к серотонину АВ-1 в разведении 1:100 (Sigma, клон 5 НТ-Н 209, США), вторичные антитела, меченные пероксидазой, с последующим докрасиванием гематоксилином.

Препараты изучались под световым микроскопом (Leica, Германия) с применением компьютерной программы анализа изображений ImageScope M (Россия). Подсчитывалось количество аргирофильных и серотонинсодержащих апудоцитов на 1 мм² площади среза слизистой оболочки гортани. Фотосъемка осуществлялась с использованием фотокамеры (Leica, Германия) при увеличении x400, x600.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Statistica 6.0: методы вариационной статистики, U-критерий Манна - Уитни ($M \pm m$, при $p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование содержания серотонина в сыворотке крови показало, что уровень его у крыс ЭГ до утопления был статистически значимо ниже, чем у крыс КГ. Однако после утопления уровень серотонина у животных ЭГ был значительно выше по сравнению с КГ (табл. 1).

Таблица 1

Содержание серотонина в сыворотке крови крыс ЭГ и КГ (пг/мл; $M \pm m$)

Показатель	ЭГ ($n = 20$)	КГ ($n = 10$)
До утопления	$35,7 \pm 2,08^*$	$40,8 \pm 3,17$
После утопления	$45,9 \pm 2,85^{**}$	

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к КГ; ** $p < 0,05$ по сравнению с показателем у крыс до утопления.
Источник: составлено авторами на основе [7].

При проведении аутопсии животных из ЭГ были выявлены следующие характерные признаки: острая эмфизема легких, петехиальные кровоизлияния под плеврой (рис. 1-3).

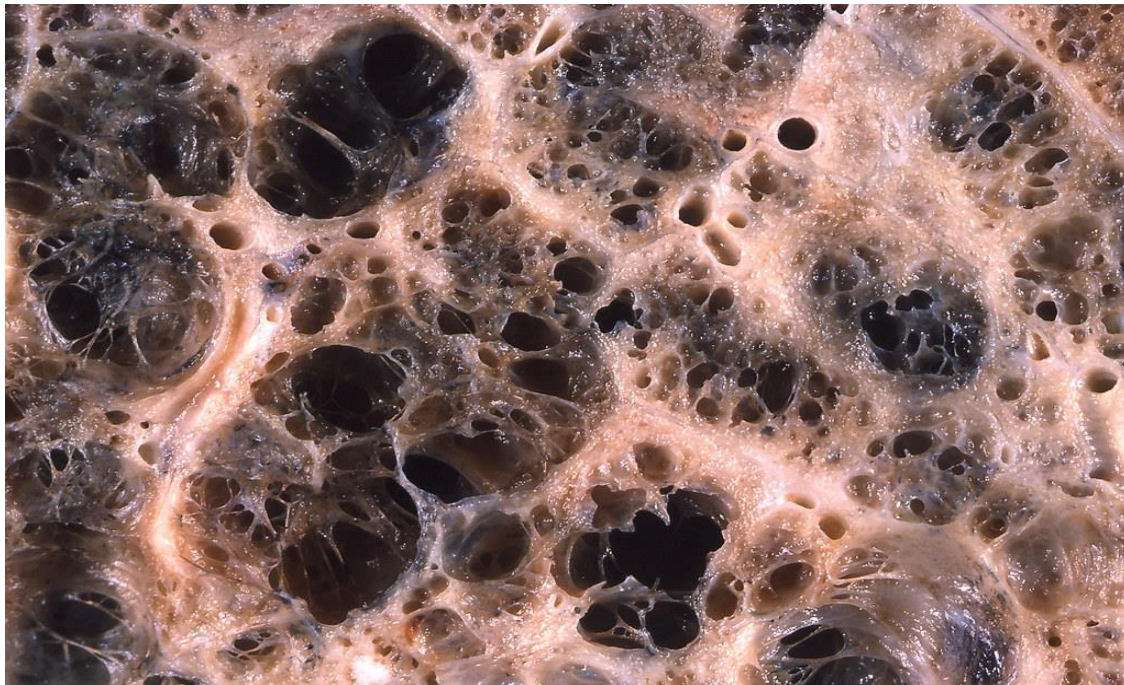


Рис. 1. Центрилобулярная эмфизема легкого (макропрепарат)

Источник: составлено авторами на основе [7].

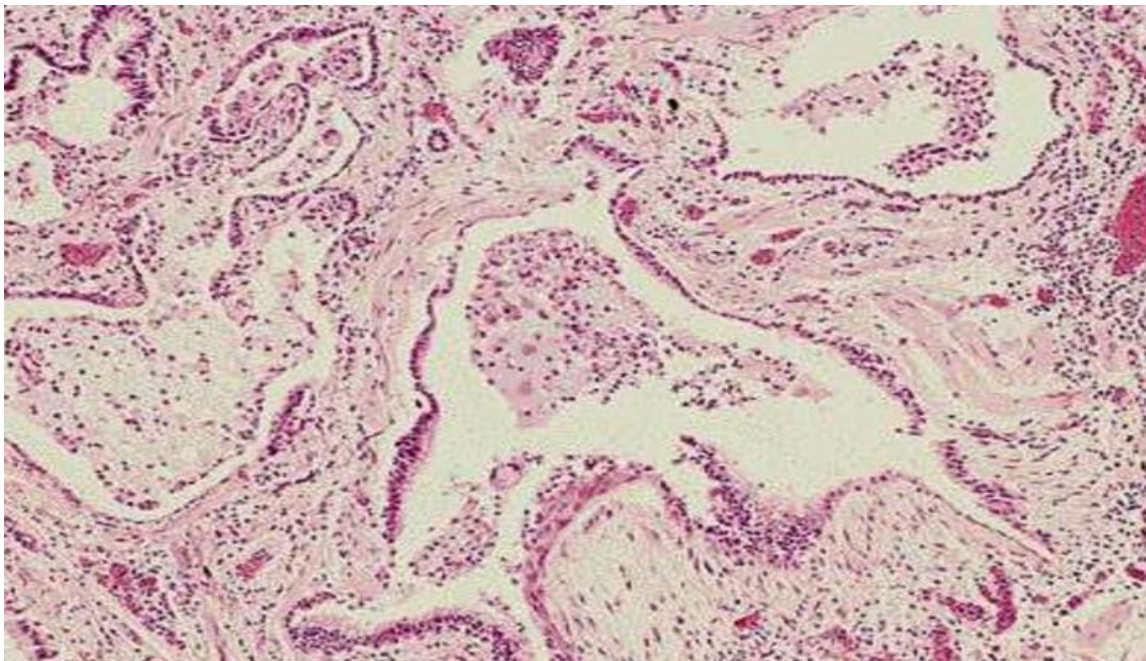


Рис. 2. Эмфизема легкого. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Источник: составлено авторами на основе [7].

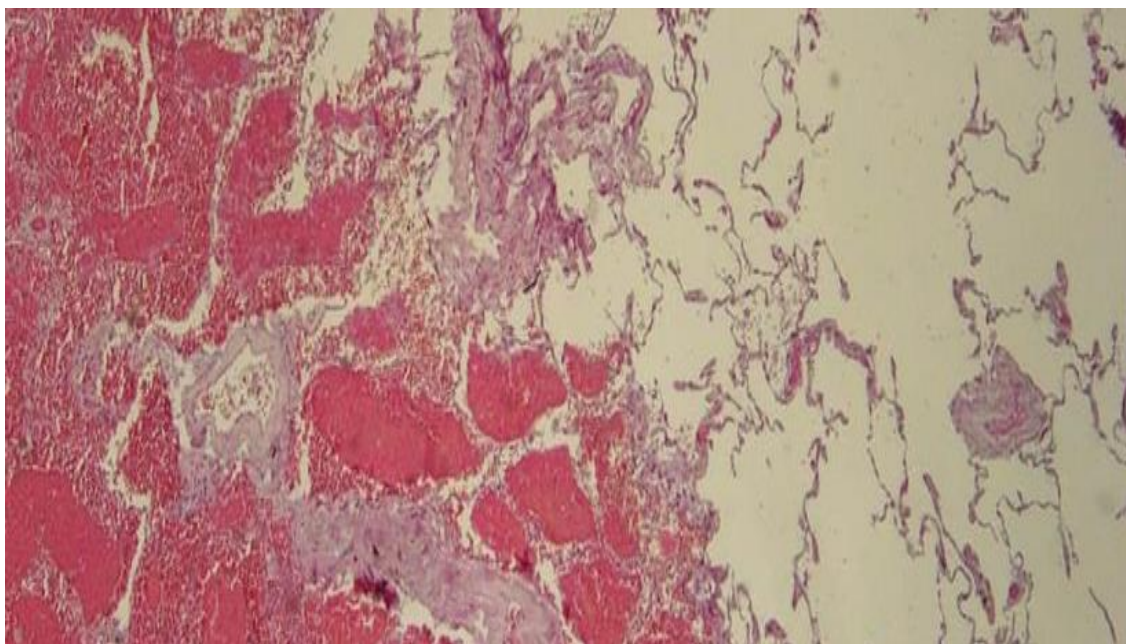


Рис. 3. Субплевральное кровоизлияние, эмфизема легкого.

Окраска гематоксилином и эозином, x100

Источник: составлено авторами на основе [7].

Наряду с этим отмечалась воздушная эмболия сосудов легких, лимфогемия грудного лимфатического протока (рис. 4, 5).

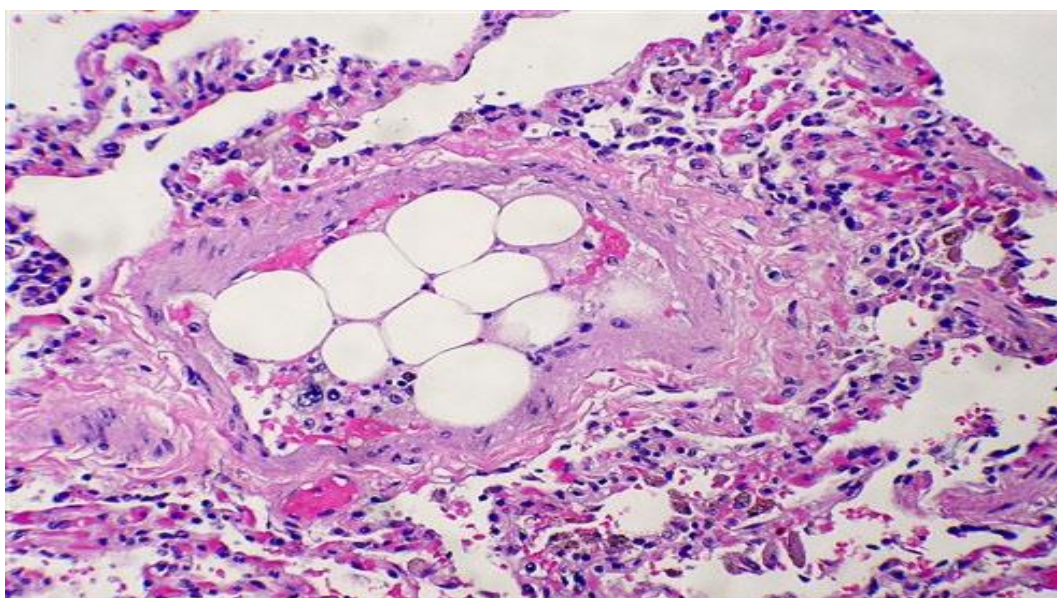


Рис. 4. Воздушная эмболия: пузырьки воздуха в вене легкого.

Окраска гематоксилином и эозином, x400

Источник: составлено авторами на основе [7].

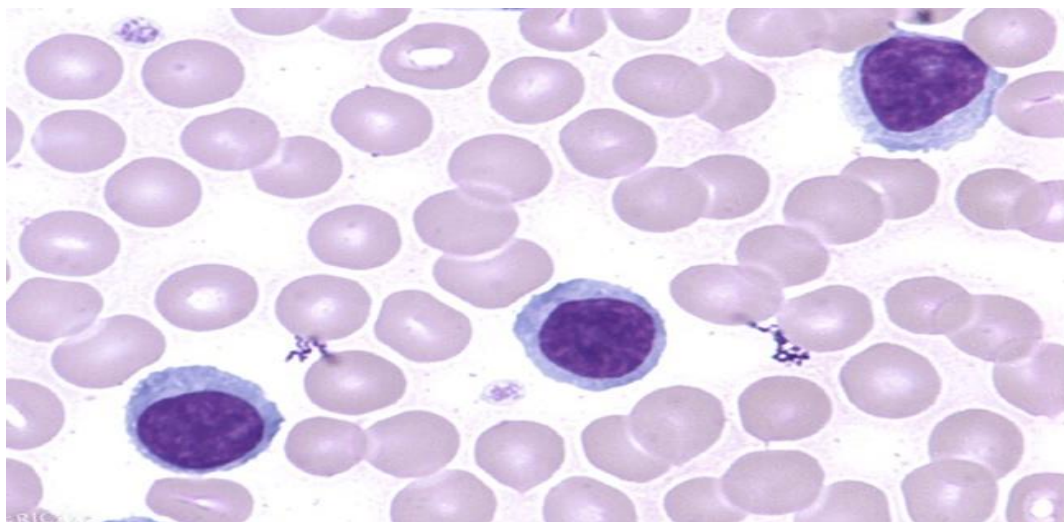


Рис. 5. Лимфогемия: эритроциты в грудном лимфатическом протоке.

Окраска по Романовскому - Гимзе, x900

Источник: составлено авторами на основе [7].

При гистологическом исследовании препаратов, окрашенных по методу Гримелиуса, с использованием иммуногистохимической реакции, в СОГ и железах обнаружены апудоциты различной формы (округлой, трапециевидной, треугольной и овальной) и окраски (от светлого до темно-коричневого цвета) (рис. 6, 7).

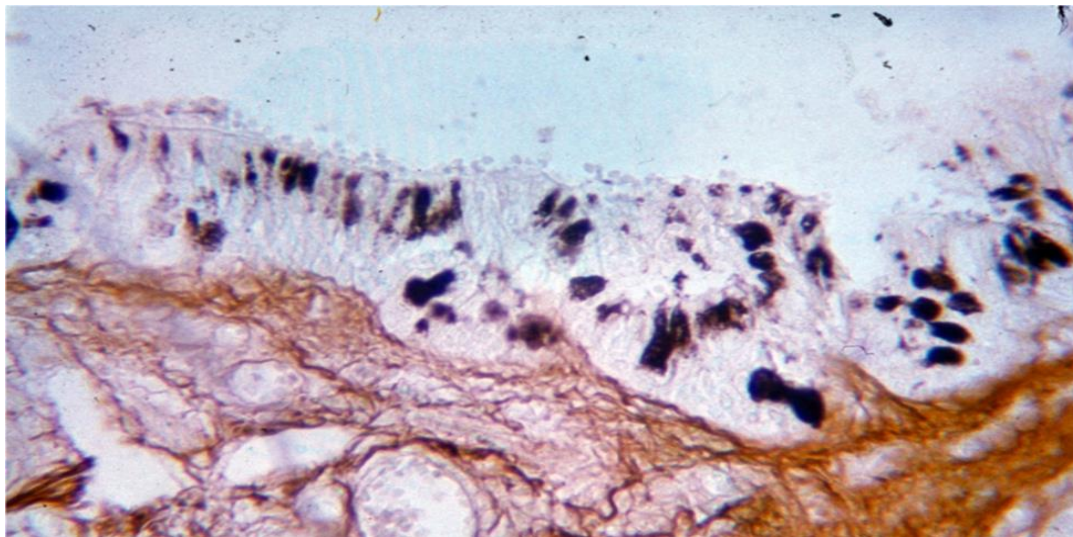


Рис. 6. Аргирофильные гранулы в апудоцитах СОГ.

Гистохимическая окраска по Гримелиусу, x400

Источник: составлено авторами на основе [7].

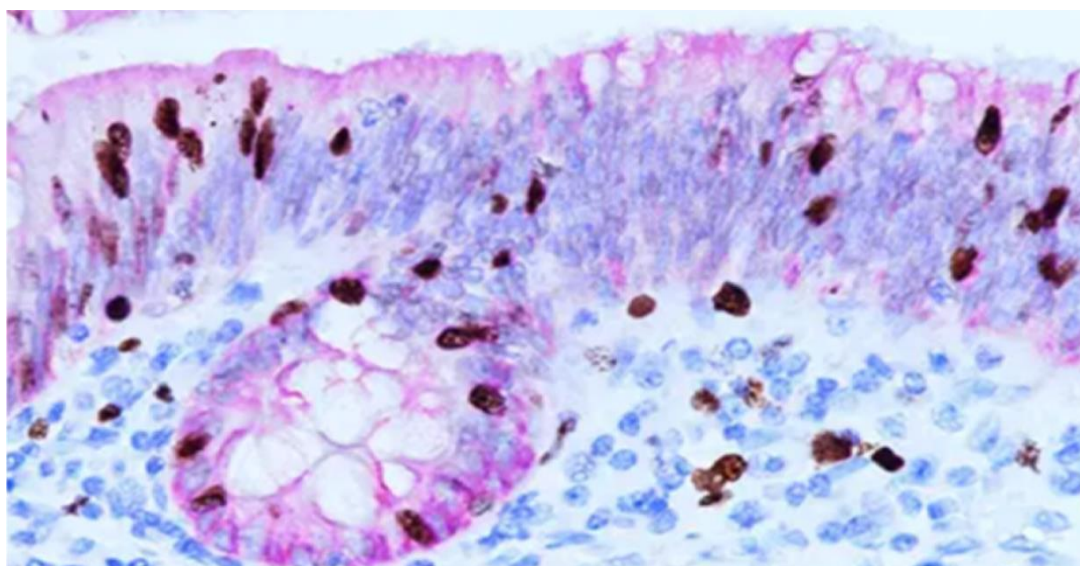


Рис. 7. Серотонинсодержащие апудоциты в СОГ. Иммуногистохимическая реакция, х600

Источник: составлено авторами на основе [7].

Морфометрический анализ показал, что в экспериментальной группе количество АПУД-клеток и серотонинпродуцирующих апудоцитов значительно превышало аналогичные показатели в контрольной группе (табл. 2).

Таблица 2

Содержание аргирофильных и серотонинпродуцирующих апудоцитов в СОГ крыс в зависимости от группы наблюдения ($M \pm m$)

Показатель	Группа наблюдения	
	ЭГ (n = 20)	КГ (n = 10)
Аргирофильные апудоциты, п/мм ²	26,91 ± 2,84*	12,82 ± 3,16
Серотонинпродуцирующие апудоциты, п/мм ²	18,53 ± 2,07*	10,31 ± 2,22

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к КГ.

Источник: составлено авторами на основе [7].

Возможно, что физическое переутомление (длительное плавание) адаптирует организм животных к стрессу [6]. Это приводит, по данным собственного исследования, к развитию острой аноксии, способствующей повышению уровня серотонина в крови и гиперплазии серотонинпродуцирующих апудоцитов в мышцах гортани, что сопровождается развитием ларингоспазма и утопления по асфиктическому типу. Кроме того, известно что в легких здорового человека количество аргирофильных и серотонинсодержащих апудоцитов существенно больше у плодов и новорожденных детей, меньше - у взрослых; их соотношение

составляет 4 : 1 [3]. Показано, что при различных патогенетических типах утопления и острых пневмониях у детей, сопровождающихся развитием гипоксии, число аргирофильных и серотонинпродуцирующих апудоцитов значительно увеличивается [7; 8], что согласуется с результатами собственного исследования.

Данные литературы свидетельствуют, что особенности патогенеза асфиктического типа утопления до конца не изучены. Считается, что фактором, определяющим наступление смерти при данном типе утопления, является развитие рефлекторного ларингоспазма в связи с попаданием воды в носоглотку и гортань [4; 9; 10, с. 258]. Наряду с этим тонкие механизмы развития ларингоспазма на клеточном уровне с участием АПУД-системы воздухоносных путей практически не изучены. В связи с этим выявленное с помощью иммуногистохимического и морфометрического анализа значительное увеличение содержания серотонинпродуцирующих апудоцитов в слизистой оболочке гортани может являться, наряду с другими морфологическими проявлениями (эмфизема легких, воздушная эмболия левых отделов сердца, мелкоточечные субплевральные кровоизлияния [11, с. 168; 12, с. 282; 13]), одним из дополнительных диагностических признаков асфиктического типа утопления [7]. Результаты исследования подтверждают известную аксиому о том, что не может быть нарушения функции без нарушения структуры и «даже ничтожнейшие функциональные изменения не могут возникнуть и исчезнуть, не отразившись в соответствующих структурных изменениях на молекулярном или ультраструктурном уровне» [14, с. 327].

Заключение

Таким образом, при иммуногистохимическом и морфометрическом исследовании АПУД-клеток в СОГ у животных 2-месячного возраста выявлено значительное увеличение количества серотонинпродуцирующих апудоцитов по отношению к аналогичному показателю крыс КГ и 6-месячного возраста. Это способствует развитию ларингоспазма без проникновения воды в воздухоносные пути и легкие при асфиктическом типе утопления. В то же время наличие феномена выраженной гиперплазии серотонинпродуцирующих апудоцитов в СОГ в условиях острой аноксии у более молодых животных может быть использовано в качестве одного из дополнительных микроскопических диагностических методов диагностики асфиктического типа утопления при экспериментальных исследованиях, а также для его апробации в судебно-медицинской практике.

Список литературы

1. Sandra I Berríos-Torres, Craig A Umscheid, Dale W Bratzler, Brian Leas, Erin C Stone, Rachel R Kelz , Caroline E Reinke, Sherry Morgan, Joseph S Solomkin, John E Mazuski, E Patchen Dellinger, Kamal M F Itani, Elie F Berbari, John Segreti, Javad Parvizi, Joan Blanchard, George Allen, Jan A J W Kluytmans, Rodney Donlan, William P Schecter. Centers for Disease Control and Prevention Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection, 2017 // JAMA Surg 2017 Aug 1. Vol.152. Is. 8. P. 784-791. DOI: 10.1001/jamasurg.2017.0904.
2. Жульжик Е.А. Диагностика утопления в современной судебной медицине // Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2015. № 4 (апрель). С. 191–195. URL: <http://e-koncept.ru/2015/15127.htm>. (дата обращения: 12.09.2025).
3. Суходоло И.В., Геренг Е.А Структурно-функциональная организация клеток диффузной эндокринной системы в дыхательных путях в норме и при патологии // Бюллетень сибирской медицины. 2008. № 1. С. 71 –75. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/strukturno-funktsionalnaya-organizatsiya-kletok-diffuznoy-endokrinnoy-sistemy-v-dyhatelnyh-putyah-v-norme-i-pri-patologii> (дата обращения: 12.09.2025).
4. Сазонов В.Б. APUD-система [Электронный ресурс]. URL: <https://kineziolog.su/content/apud-sistema> (дата обращения 5.09.2025).
5. Хохлов В.В., Андрейкин А.Б. Судебная медицина: учебник и практикум для высших учебных заведений. 5-е изд., перераб. и доп. Москва: Издательство Юрайт, 2024. 451 с. ISBN: 978-5-534-17799-2.
6. Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Зайцев К.В., Жукова О.Б., Гутор С.С., Светлик М.В., Абдулкина Н.Г., Зайцев А.А. Адаптационные реакции крыс после светового дисхроноза и физического переутомления // Вестник сибирской медицины. 2018. Т. 17. № 3. С. 22-34. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-3-22-34.
7. Гиниатуллин Р.У., Мельникова Е.Р., Гиниатуллина Г.Н. Патент РФ №2812703 «Способ диагностики асфиктического типа утопления животных в эксперименте». Патентообладатель «ФГБОУ ВО ЮУГМУ». 2024. Бюл. № 4.
8. Гиниатуллин Р.У., Кузьмин В.Н. Функциональная и количественная морфология апудоцитов гортани при асфиктическом и аспирационном типах утопления в пресной воде (экспериментальное исследование)// Вестник Уральской медицинской академической науки. 2023. Т. 20. № 3. С. 24-30. DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-3-24-30.
9. Гиниатуллин Р.У. Патогенетические и морфологические аспекты острой пневмонии у детей раннего возраста // Архив патологии. 1993. Вып. 5. С. 38-44.

10. Фирсов А.С., Калинина Е.Ю. Диагностика утопления: эволюция подходов и современные методы // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=19598> (дата обращения: 12.09.2025).
11. Руководство по судебной медицине / Под ред. В.Н. Крюкова, И.В. Буромского. М.: Норма: ИНФРА. 2014. 656 с. ISBN: 978-5-16-009099-3.
12. Самищенко С.С. Судебная медицина: учебник для вузов. 3-е изд., перераб. и доп. Москва: Издательство Юрайт, 2025. 471 с. ISBN: 978-5-9916-7690-8. URL: <https://urait.ru/bcode/559651> (дата обращения: 05.09.2025).
13. Судебная медицина: учебник / под ред. Ю.И. Пиголкина. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 496 с. ISBN: 978-5-9704-2103-1.
14. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека Учеб. для студентов ст. курсов мед. вузов, интернов, клин. ординаторов и слушателей фак. (ин-тов) усовершенствования врачей. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1997. 608 с. ISBN: 5-225-02782-2.